

## Tesis Doctoral

# Acople del pool de vesículas inmediatamente liberable (IRP) con los canales de $\text{Ca}^{2+}$ tipo P/Q y límites funcionales de este pool en células cromafines

Alvarez, Yanina Daniela

2011

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en [digital.bl.fcen.uba.ar](http://digital.bl.fcen.uba.ar). Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in [digital.bl.fcen.uba.ar](http://digital.bl.fcen.uba.ar). It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

#### Cita tipo APA:

Alvarez, Yanina Daniela. (2011). Acople del pool de vesículas inmediatamente liberable (IRP) con los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  tipo P/Q y límites funcionales de este pool en células cromafines. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

#### Cita tipo Chicago:

Alvarez, Yanina Daniela. "Acople del pool de vesículas inmediatamente liberable (IRP) con los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  tipo P/Q y límites funcionales de este pool en células cromafines". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2011.

**EXACTAS** UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



**UBA**

Universidad de Buenos Aires



**UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES**

**Facultad de Ciencias Exactas y Naturales**

***Acople del pool de vesículas inmediatamente liberable (IRP)  
con los canales de  $Ca^{2+}$  tipo P/Q y límites funcionales de este  
pool en células cromafines***

Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires en el área  
**CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**Yanina Daniela Álvarez**

***Director de Tesis: Fernando Diego Marengo***

Consejero de Estudios: Osvaldo Daniel Uchitel

Lugar de trabajo: Instituto de Fisiología, Biología Molecular y Neurociencias (CONICET), Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires.

*Buenos Aires, 2011*

## **Resumen**

*El pool de vesículas inmediatamente liberables (IRP) es un pequeño pool vesicular que corresponde aproximadamente al 25% del pool de vesículas preparadas para liberarse. Se piensa que el IRP, a diferencia del resto del pool de vesículas preparadas para ser liberadas (RRP), se libera frente a pulsos despolarizantes de corta duración debido a su proximidad a los canales de  $\text{Ca}^{2+}$ . Pusimos a prueba esta hipótesis utilizando buffers de  $\text{Ca}^{2+}$  exógenos rápidos y lentos, y toxinas específicas que permitieron asociar específicamente a la exocitosis de IRP con los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  de tipo P/Q. Estos resultados son coherentes con lo observado previamente por nosotros en ratones KO de la subunidad  $\alpha_{1A}$ . Esto nos llevó a pensar en la posibilidad de que este acople funcional fuera generado a través de una interacción molecular específica. Evaluamos que dicha interacción estuviera mediada por la secuencia synprint (synaptic protein interaction site) ubicada en un loop intracelular de la subunidad  $\alpha_{1A}$  de los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  P/Q y N. Es conocido que el synprint puede interactuar con la maquinaria exocitótica, siendo esto determinante en el acople asociado a la exocitosis sincrónica en terminales nerviosas. De acuerdo con esta hipótesis, en diversos experimentos encontramos que las células de ratón en cultivo transfectadas con la secuencia del synprint (para interferir en la interacción canal / vesícula) presentan una exocitosis de IRP marcadamente disminuida, mientras que fases menos acopladas al estímulo no se hallar alteradas. La segunda parte de esta tesis está enfocada en analizar los límites funcionales del IRP frente a una estimulación que simule las condiciones fisiológicas de las células cromafines, como son los trenes de potenciales de acción a frecuencias en el rango 0.2-10 Hz. Descubrimos una fracción de IRP que se libera particularmente frente a potenciales de acción que es capaz de recuperarse velozmente ( $\tau \sim 1$  seg) luego de haber sido deprimida. Los resultados muestran que en nuestras condiciones experimentales dicho subpool de IRP le permite a las células cromafines mantener una liberación eficiente y sostenida a bajas frecuencias*

*Palabras clave: Exocitosis, canales de  $\text{Ca}^{2+}$ , IRP, synprint, células cromafines.*

## ***Abstract***

*The Immediately Releasable Pool (IRP) is a small group of vesicles which corresponds to approximately the 25% of the ready releasable vesicles. IRP, in contrast to the rest of the RRP, can be released by short pulses because of its proximity to calcium channels in chromaffin cell. We used specific pharmacological  $\text{Ca}^{2+}$  channels blockers and  $\alpha_{1A}$  subunit KO mice to demonstrate that IRP exocytosis is specifically coupled to P/Q  $\text{Ca}^{2+}$  current. This coupling raises the question of how the interaction between IRP vesicles and P/Q  $\text{Ca}^{2+}$  channels is produced. The synprint sequence located in the intracellular loop between II and III region of the  $\alpha 1$  subunit of P/Q and N  $\text{Ca}^{2+}$  channels can interact with proteins of the exocytic machinery being determinant in vesicle-channel coupling associated to fast exocytosis. The chromaffin mouse cells transfection with IRES plasmids containing the synprint peptide sequence (to interfere with channel-exocytic proteins interaction) reduced IRP exocytosis significantly, while less coupled exocytosis remained unchanged. The existence of such highly coupled exocytosis raises the question of which is the participation of IRP when chromaffin cells are stimulated with a physiological stimulus, particularly trains of action potentials. We study the recovery of IRP after complete release, and the exocytic performance of this pool at different frequencies of stimulation. We found that there is a fraction of IRP, that is released by an action potential and recovers with relatively high speed ( $\tau \sim 1$  s), which is able to sustain chromaffin cell exocytosis at physiological low frequencies.*

***Key words:*** Exocytosis,  $\text{Ca}^{2+}$  channel, IRP, synprint, chromaffin cells.

## ÍNDICE

<b>1 INTRODUCCIÓN</b>	<b>1</b>
1.1 Médula Adrenal y Células Cromafines.....	1
1.1.1 Generalidades.....	1
1.1.2 Potencial de acción.....	3
1.1.3 Las catecolaminas están empaquetadas en vesículas.....	5
1.1.4 La médula adrenal y la respuesta al estrés.....	7
1.1.5 Ventajas como modelo neurobiológico.....	8
1.2 Señales de calcio en células cromafines.....	12
1.2.1 Fuentes extracelulares de calcio.....	12
1.2.1.1 Canales de calcio.....	12
1.2.2 Fuentes intracelulares de calcio.....	16
1.2.3 Sistemas de remoción y regulación del calcio citosólico.....	18
1.2.4 Características espaciales y temporales de las señales de calcio.....	20
1.3 Exocitosis en células cromafines.....	23
1.4 La cinética de la respuesta secretoria y su asociación con los grupos de vesículas.....	28
1.5 EL IRP.....	31
1.6 Acople entre los canales de calcio y las vesículas secretorias.....	36
1.7 Endocitosis.....	38
1.7.1 Endocitosis lenta.....	38
1.7.2 Endocitosis rápida.....	39
1.8 Ciclado vesicular, recuperación y regulación del IRP.....	41
 <b>2 RESULTADOS PRELIMINARES A ESTA TESIS</b>	 <b>45</b>
2. Tipos de canales de calcio asociados al IRP.....	45
 <b>3 OBJETIVOS</b>	 <b>50</b>
3.1 Objetivo general.....	50
3.1.1 Objetivos particulares.....	50
 <b>4 MATERIALES Y MÉTODOS</b>	 <b>52</b>
4.1 Cultivo y transfección de células cromafines.....	52
4.1.1 Soluciones de cultivo y transfección.....	52
4.1.2 Procedimiento para el cultivo.....	52

4.1.3 Procedimiento para la transfección.....	54
4.2 Técnica <i>patch clamp</i> .....	55
4.2.1 Generalidades.....	55
4.2.2 Circuito equivalente de la célula y medición de capacitancia celular.....	57
4.2.3 Métodos para calcular los componentes del circuito equivalente.....	59
4.2.4 Dispositivo de <i>patch clamp</i> .....	61
4.2.5 Preparación de micropipetas.....	62
4.2.6 Soluciones experimentales para los experimentos de <i>patch clamp</i> .....	63
4.2.7 Protocolos de estimulación utilizados para la medición de la capacitancia celular.....	64
4.2.7.1 Protocolo de pulsos pareados.....	66
4.3 Técnica de <i>imaging</i> con FM.....	68
4.3.1 Características de los fluoróforos tipo FM .....	68
4.3.2 Dispositivo experimental.....	69
4.3.3 Soluciones utilizadas.....	70
4.3.4 Protocolo básico para la medición de exocitosis.....	70
4.4 Análisis de datos y estadística.....	72
4.4.1 Procesamiento de los experimentos electrofisiológicos.....	72
4.4.2 Procesamiento de los experimentos de <i>Imaging</i> .....	73
4.4.3 Estadística.....	73
4.5 Reactivos y químicos.....	74
4.6 Simulaciones computacionales.....	74
4.6.1 Geometría.....	74
4.6.2 Simulación de las corrientes de calcio.....	75
4.6.3 Dinámica del calcio: Difusión y reacción con los <i>buffers</i> .....	76
4.6.4 Exocitosis.....	77
<b>5 RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b> .....	<b>78</b>
5.1 Características del IRP .....	78
5.1.1 Estimación del IRP.....	78
5.1.2 Efecto del <i>buffer</i> rápido BAPTA sobre la exocitosis de las vesículas del IRP.....	80
5.1.3 Efecto de BAPTA sobre la exocitosis de las vesículas poco acopladas al estímulo.....	82
5.1.4 Trenes de despolarizaciones: Componentes altamente y pobremente acoplados.....	82
5.1.5 Discusión.....	84
5.2 Canales de calcio asociados al IRP.....	87
5.2.1 Discusión.....	93

5.3 Mecanismo de acople entre canales P/Q y las vesículas del IRP.....	94
5.3.1 Exocitosis del IRP en células transfectadas con <i>synprint</i> .....	94
5.3.2 Efecto de la transfección con <i>synprint</i> sobre las corrientes de calcio.....	98
5.3.3 Respuesta exocitótica a trenes de despolarizaciones en células transfectadas con <i>synprint</i> .....	99
5.3.4 Efecto de la transfección con <i>synprint</i> sobre la exocitosis masiva medida con FM4-64..	102
5.3.5 Discusión.....	103
5.4 Participación del IRP en el rango de frecuencias fisiológicas de disparo de la célula cromafín.....	106
5.4.1 Recuperación del IRP.....	107
5.4.2 Efecto de la concentración de calcio citosólica sobre el IRP.....	109
5.4.3 Papel regulador del calcio citosólico sobre la velocidad de recuperación.....	111
5.4.4 Exocitosis en respuesta a despolarizaciones que simulan potenciales de acción.....	113
5.4.5 Recuperación del PPA.....	117
5.4.6 Endocitosis frente a un PAs.....	123
5.4.7 Discusión.....	128
5.5 Trenes de potenciales de acción.....	131
5.5.1 Trenes a baja frecuencia.....	132
5.5.2 Trenes a alta frecuencia.....	134
5.5.3 Discusión.....	136
 <b>6 DISCUSIÓN FINAL</b>	 <b>140</b>
 <b>ANEXO:SIMULACIONESCOMPUTACIONALES</b>	 <b>146</b>
A.1 Condiciones iniciales .....	146
A.1.1 Corrientes de calcio.....	146
A.1.2 <i>Buffers</i> .....	147
A.2 Simulaciones.....	149
A.2.1 Exocitosis del IRP.....	152
A.2.2 Efecto del <i>synprint</i> sobre la exocitosis del IRP.....	153
 <b>REFERENCIAS</b>	 <b>154</b>

## *AGRADECIMIENTOS*

*A mi director, Fernando por su paciencia y dedicación.*

*A mis compañeros de grupo, Andrés y Verónica.*

*A Osvaldo, y a todas las personas que formaron o forman parte de su grupo: Bárbara, Silvana, Itatí, Paula F., Carlota, Francisco M, Elisa, Ezequiel, Dana, Roberto, Mariano, Eugenia, Laura, Eugeneña, Paula P., Carina, Belén, Francisco U, Ramona, Karen, Joaquín, Lucas, Noelia y José. A todos les agradezco por haberme ayudado a realizar esta tesis y por los momentos compartidos durante todos estos años.*

*A los integrantes de los otros grupos del FBMC.*

*A Agustín.*

*A mi familia.*



*A mi mamá*

## ***Lista de abreviaturas***

Aga:  $\omega$ -agatoxina IVA.

BAPTA: 1,2-Bis(o-AminoPhenoxy)ethane-N,N,N',N'-Tetraacetic Acid.

CCDV: Canales de calcio dependientes de Voltaje.

C<sub>m</sub>: Capacitancia celular.

Cono:  $\omega$ -conotoxina GVIA.

EGTA: *Ethylene Glycol Tetraacetic Acid*.

HVA: *high voltage activated*.

ICa<sup>2+</sup> : Corriente de Ca<sup>2+</sup>

IP<sub>3</sub>R: receptores de IP<sub>3</sub>.

IRP: *Immediately Releasable Pool*.

KO: *Knock out*.

LVA: *Low Voltage Activated*.

NCAM: Molécula de adhesión de células neuronales.

Nitre: Nitrendipina.

PA: Potencial de acción.

PAs: Potencial de acción simulado.

PPA: *pool* de vesículas liberadas por un potencial de acción.

QCa<sup>2+</sup>: Integral de corriente de Ca<sup>2+</sup>.

RE: Retículo endoplasmático.

RP: *Reserve pool*.

RRP: *Ready releasable pool*.

RyR: Receptores de rianodina.

SNAP-25: *Synaptosomal-associated protein of 25 kDa*.

SNARE: *soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptors*.

SRP: *Slowly releasable pool*.

TIRFM: *Total internal reflection fluorescent microscopy*.

t-SNARE: *SNARE target*.

UPP: *Unprimed pool*.

V<sub>m</sub>: potencial de membrana.

v-SNARE: SNARE vesicular.

WT: *wild type*.

$\Delta C_m$ : Cambios de capacitancia celular.

## ***1 INTRODUCCIÓN***

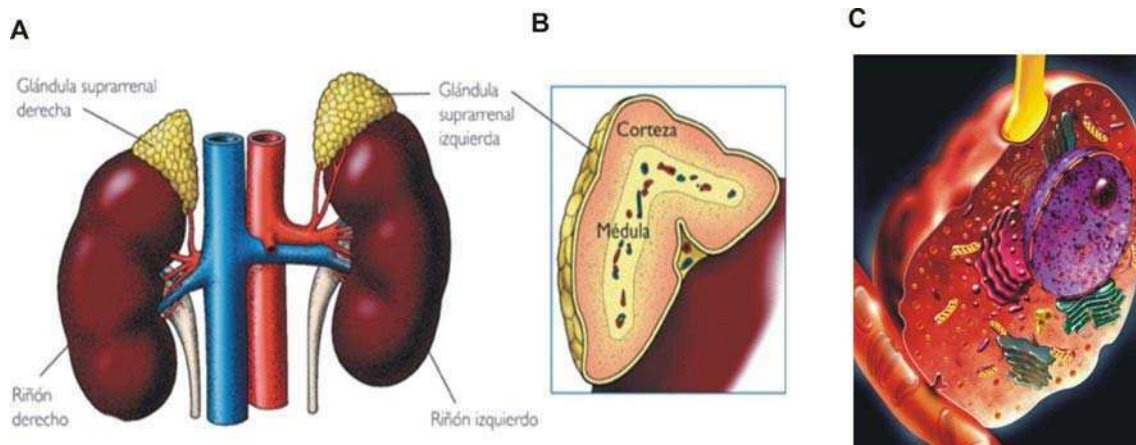
### ***1.1 Médula Adrenal y Células Cromafines***

#### ***1.1.1 Generalidades***

La glándula suprarrenal se ubica anatómicamente en el extremo superior de los riñones y está constituida por dos órganos que coexisten espacialmente pero con marcadas diferencias funcionales y embriológicas: la corteza y la médula suprarrenal (Figura 1.1). En la médula suprarrenal se encuentran las células cromafines que producen y secretan fundamentalmente catecolaminas tales como adrenalina y, en menor medida, su precursor noradrenalina, además del neuropéptido Y. Por otro lado, la corteza de la glándula suprarrenal está compuesta por células fasciculadas, glomerulares y reticuladas que secretan glucocorticoides, mineralocorticoides y una pequeña fracción de hormonas sexuales. Aparte de sus muchos efectos sobre órganos a distancia, estos esteroides también cumplen una función parácrina sobre la médula adrenal (Bornstein y col., 1997). Su acción está involucrada en la función y en la estructura de las células cromafines, ya que favorece la producción de adrenalina a partir de noradrenalina y evita la formación de prolongaciones en estas células. Es sabido que las células cromafines en cultivo, eventualmente generan procesos de características similares a las neuritas (Trifaró y Lee, 1980; Unsicker y col., 1978), y que el agregado de esteroides al medio de cultivo inhibe este crecimiento (Anderson y Axel, 1986).

La médula adrenal comparte un origen embriológico con el sistema simpático, ya que al igual que éste proviene del neuroectodermo (Weston, 1970; Aloe y Levi-Montalcini 1979; Tischler, 2002). Algunos de los progenitores neuronales provenientes de la cresta neural originan el sistema simpático, mientras que otros migran e invaden la corteza suprarrenal (Le Douarin y col., 2008) dando lugar a la médula de dicha glándula. Más tarde, como consecuencia de la actividad de diversos factores de crecimiento (Dutt y col., 2006; Barald, 1982) que estimulan la vía del AMP cíclico, las células se diferencian y se induce la síntesis de catecolaminas (Bilodeau y col., 2000; Bilodeau y col., 2005). Por su origen y por su ubicación, la médula suprarrenal es considerada un ganglio simpático modificado (Díaz-Flores y col., 2008), y las células cromafines que la componen son neuronas modificadas que no poseen axones y liberan sus productos de secreción directamente al torrente

sanguíneo actuando como neurohormonas (Figura 1.1-C) (Donald y Sheperd, 1980). Las neuronas postganglionares del sistema nervioso autónomo también producen y secretan catecolaminas, que funcionan como neurotransmisores. Por otro lado, al igual que en un ganglio simpático, las células cromafines son estimuladas por terminales colinérgicas preganglionares del sistema simpático.



**Figura 1.1** - (A) La representación muestra la localización de la glándula suprarrenal y sus relaciones anatómicas con el riñón. (B) En un corte de la glándula se pueden diferenciar la médula y la corteza. (C) Se representa la ultraestructura de una célula cromafín. Nótese el contacto directo de la misma con un terminal nervioso responsable de su estimulación y con un capilar sanguíneo hacia donde se secretan las catecolaminas mediante exocitosis.

Las células cromafines son entonces inervadas por fibras preganglionares simpáticas del nervio esplácnico (Hirano, 1982). Las células se encuentran dispuestas en cordones (Díaz - Flores y col., 2008) lo cual favorece la relación con los capilares, a los que liberan sus productos de secreción (Figura 1.1 C). Los terminales axónicos del nervio esplácnico liberan acetilcolina sobre las células cromafines, las cuales poseen receptores colinérgicos de membrana que se unen con alta afinidad a este neurotransmisor. Estos receptores se clasifican en dos grupos principales: muscarínicos y nicotínicos. La secreción en las células cromafines es mayormente estimulada por la activación de receptores nicotínicos, que son receptores del tipo ionotrópicos. Sin embargo en estas células también hay receptores muscarínicos, metabotrópicos acoplados a proteína G, que pueden contribuir a la regulación de la secreción de catecolaminas (Aguilar, 1992). Dentro de los receptores muscarínicos hay cinco subtipos ( $M_1$ - $M_5$ ). En células cromafines vacunas se observó mayor proporción del

subtipo  $M_2$ , y en menor proporción los subtipos  $M_1$ ,  $M_3$  y  $M_4$  (Aguilar y col., 1992; Fernando y col., 1991; Olivos y Artalejo, 2008). En cuanto a los receptores nicotínicos, el subtipo más importante en las células cromafines es el complejo pentamérico formado por las subunidades  $\alpha_3$  y  $\beta_4$  que forman el canal que atraviesa la membrana (Sala y col., 2008). Cuando el receptor es activado por la acetilcolina liberada desde los terminales neuronales, este canal aumenta su permeabilidad a cationes, ingresando fundamentalmente  $Na^+$ , despolarizando la membrana, y consecuentemente, generando el disparo de potenciales de acción (PA). A consecuencia de esto se activan canales de  $Ca^{2+}$  dependientes de voltaje (CCDV) en la membrana plasmática, y se produce la entrada de  $Ca^{2+}$  que dispara la exocitosis de las vesículas secretorias que contienen las catecolaminas y otras sustancias activas.

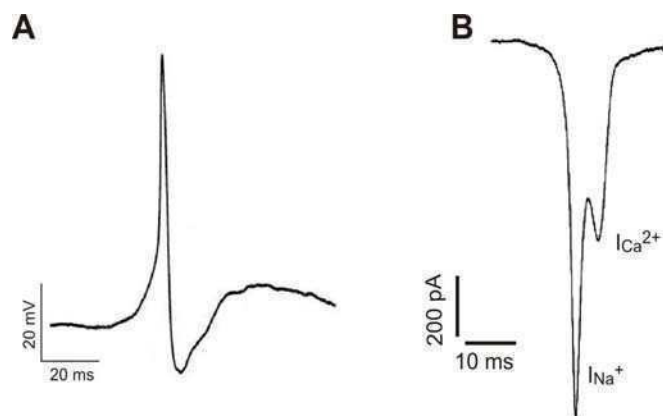
### ***1.1.2 Potencial de acción***

En todas las células en reposo existe una diferencia de potencial eléctrico entre el interior y el exterior celular, denominado potencial de membrana ( $V_m$ ) (por convención,  $V_{intra}-V_{extra}$ ). Este potencial depende de las concentraciones intracelulares y extracelulares de los diferentes iones y de las conductividades relativas de la membrana a ellos. En las células no excitables este potencial tiene generalmente valores entre -10 y -30 mV, mientras que en las excitables es próximo a valores entre -50 y -90 mV. En estudios realizados en los años 60 se estimó un valor para el potencial de reposo en células cromafines de alrededor de -30 mV (Douglas y col., 1967ab; Matthews y col., 1967; Fawcett y col., 1969). Las mejoras en las técnicas experimentales introducidas por la técnica de *patch clamp* permitieron estimar este valor entre -50 y -80 mV (Fenwick y col., 1982). En estudios más recientes por registros de *patch* perforado en células bovinas se midió un valor de -50 mV (Wallace y col., 2002; Orozco y col., 2006).

Cuando las células cromafines son excitadas, tanto fisiológicamente por la acetilcolina liberada o por otros métodos, se disparan PA en la membrana plasmática. La fase de subida del PA en algunos casos es dominada sólo por la entrada de iones de  $Na^+$  (Biales y col., 1976) mientras que en otros casos se observó que depende tanto de los canales de  $Na^+$  como de los de  $Ca^{2+}$  (Brandt y col., 1976; Kidokoro y Ritchi, 1980; Nassar-Gentina y col., 1988) (Figura 1.2 B). La repolarización del PA en las células cromafines depende principalmente de la inactivación de los canales de  $Na^+$  (Solaro y col., 1995). Además de los

canales de  $\text{Na}^+$ , también se ha observado que la presencia de canales de  $\text{K}^+$  dependientes de voltaje (Inoue y Imanaga, 1993) y dos variantes de los canales de  $\text{K}^+$  activados por  $\text{Ca}^{2+}$  tipo BK (Solaro y Lingle, 1992; Solaro y col., 1997) contribuyen a la repolarización del PA, regulando el patrón de disparo de estas células (González-García y col., 1993; Lara y col., 1995; Montiel y col., 1995).

Como se mencionó en la sección anterior, la frecuencia de PA en las células cromafines “in situ” es controlada por la activación de los receptores nicotínicos. El disparo de PA espontáneos fue estudiado en cultivos de células cromafines de gerbos, humanos, ratas y vacas (Biales y col., 1976; Brandt y col., 1976, Kidokoro y Ritchie 1980, Kidokoro y col., 1982, Zhang y col., 1997, Micheletti y col., 2005; Wallace y col., 2002, de Diego y col., 2006). La frecuencia de aparición de PA espontáneos es muy irregular aunque se estimó en alrededor de 0,2 Hz (Wallace y col., 2000). Estos PA tienen amplitud muy variable, con valores entre 52 mV y 78 mV (de Diego, 2009).



**Figura 1.2** - Potencial de acción en células cromafines (A) Ejemplo de un PA generado por un “puff” de 25 mseg de acetilcolina en una célula cromafin bovina. (B) Las corrientes que subyacen al PA son de  $\text{Na}^+$  y de  $\text{Ca}^{2+}$ , por la rápida inactivación de las corrientes de  $\text{Na}^+$  las dos corrientes están separadas temporalmente (Modificados de Diego, 2009 y de Diego, 2008).

Las corrientes de  $\text{Ca}^{2+}$  que se activan durante un PA son el disparador natural de la exocitosis en las células cromafines, como en otras células neuroendocrinas y en neuronas (Aunis D, 1998; Check y Barry, 1993; Livett, 1993). La eficiencia de esta corriente de  $\text{Ca}^{2+}$  para inducir endocitosis varía según el tipo de preparación. La exocitosis generada por un PA individual en rebanadas de la médula adrenal de ratón es de ~7 vesículas, mientras que en células aisladas en cultivo se midieron valores inferiores (~2 vesículas) (Moser y Neher,

1997; Zhou y Misler, 1995). Esta discrepancia se debería a diferencias en el acoplamiento de los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  y las vesículas entre las dos preparaciones (esto punto se discutirá más profundamente en otras partes de esta tesis).

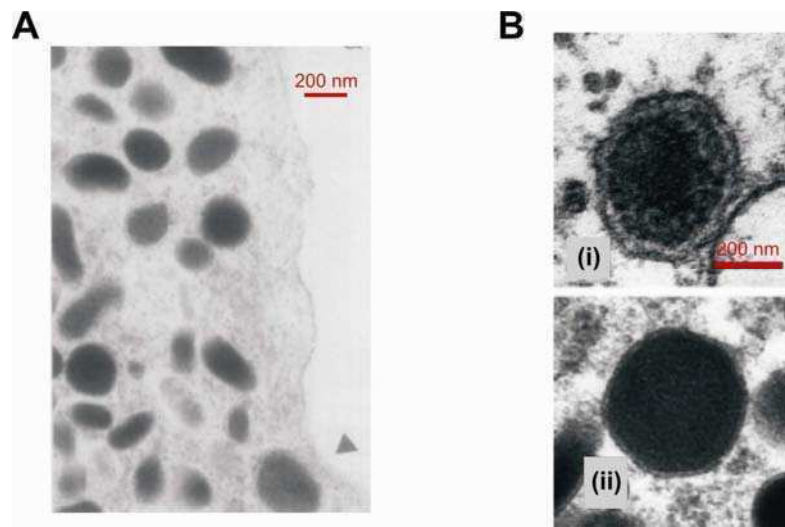
### ***1.1.3 Las catecolaminas están empaquetadas en vesículas***

El producto de secreción más importante de las células cromafines es la adrenalina, la cual pertenece a un grupo de sustancias, las catecolaminas, que incluye también a la dopamina y a la noradrenalina. Estas dos últimas son productos metabólicos intermedios en la síntesis de la adrenalina a partir de un precursor común, el aminoácido tirosina. El primer paso en la síntesis de las catecolaminas es catalizado por la enzima tirosina hidroxilasa que es el paso limitante en la ruta biosintética. El paso de dopamina a noradrenalina lo cataliza la enzima dopamina  $\beta$ -hidroxilasa, a partir de ascorbato y oxígeno y en el último paso, la transformación de noradrenalina en adrenalina es llevada a cabo por la enzima feniletanolamina N-metiltransferasa. Toda la adrenalina circulante procede de la secreción de la médula suprarrenal, la cual genera una concentración en sangre basal de 250 pg/ml (de Diego y col., 2008). En cambio, la noradrenalina es también producida y secretada por neuronas del sistema nervioso autónomo, donde funciona como neurotransmisor (Purves y col., 2004). Prácticamente toda la noradrenalina circulante deriva de las terminaciones nerviosas simpáticas y del encéfalo que se escaparon de la recaptación local de las brechas sinápticas. La poca noradrenalina producida por la médula suprarrenal y liberada a la sangre tiene una vida media muy breve porque se destruye en el hígado poco después de su descarga (Donald y Sheperd, 1980).

Las catecolaminas producidas en las células cromafines son acumuladas dentro de estructuras membranosas denominadas vesículas por un mecanismo de transportador de monoaminas (Erickson y col., 1996) que utiliza el gradiente de  $\text{H}^+$  generado por una bomba  $\text{H}^+$ -ATPasa (Dean y col., 1986). Por esta razón el pH de las vesículas es ácido con un valor aproximado de 5.5. Existen dos tipos de transportadores, llamados VMAT1 y VMAT2 (por *vesicular monoamine transporter*), y las células cromafines expresan ambos (Erickson y col., 1996).

Existen diferentes tipos de vesículas en las células cromafines: los vesículas secretorias que son gránulos grandes de ~200 nm de diámetro, electrodensos, que contienen las

catecolaminas y otros componentes; y las vesículas pequeñas (~40 nm) de baja densidad, similares a las vesículas sinápticas (Koval y col., 2001; Annaert y col., 1993; Tanner y col., 1996). Por medio de microscopia electrónica se estimó que el número de vesículas secretorias que contienen adrenalina es ~17000 que corresponde al 71% de vesículas secretorias mientras que las que contienen noradrenalina son ~7000 (Vitale y col., 1995).



**Figura 1.3** - Microscopia electrónica de la zona cortical de una célula cromafín bovina (A) En esta imagen se observa la ubicación de las vesículas secretorias con respecto a la membrana plasmática (Imagen extraída de Vitale y col., 2005). (B) Se observan las diferencias entre las vesículas cargadas con adrenalina de las cargadas con noradrenalina. (i) Las vesículas que contienen adrenalina muestran un halo en su periferia mientras que las que contienen (ii) noradrenalina son sólidas (Imágenes modificadas de E. Crivellato y col., 2008)

Además de las mencionadas catecolaminas, los vesículas secretorias contienen ATP, proteínas como la cromogranina (Banks y Hell, 1965; O'Connor y Frigon, 1984), y péptidos menores como el neuropéptido Y y las encefalinas (Lewis y col., 1979; Viveros y col., 1979). Si bien la formación de las vesículas secretorias aun no se comprende completamente, éstos se producen en el trans-Golgi, donde las mencionadas proteínas son plegadas (Crivellato y col., 2008). Las cromograninas son necesarias para la misma formación de los vesículas secretorias (Stettler y col., 2009), confiriéndoles justamente sus típicas características electrodensas debidas al empaquetamiento de estas proteínas conjuntamente con cationes que neutralizan sus cargas negativas.



La cantidad total de vesículas secretorias liberables estimada por medio de técnicas fisiológicas no coincide con el número total de vesículas determinado por estudios morfológicos (Vitale y col., 1995). Las vesículas secretorias realmente liberables oscilan entre 2000 a 6000 vesículas (Phillips y col., 1983; Heinemann y col., 1993). La contribución a la membrana plasmática por la fusión de una vesícula secretoria individual fue estimada en 1,3 fF (Moser y Neher, 1997b). Para esta estimación fue necesario diferenciar las vesículas secretorias de las vesículas pequeñas que no liberan adrenalina, para ello se utilizó simultáneamente, la técnica de medición de exocitosis mediante el aumento en la capacitancia celular y la técnica de amperometría que permite medir la secreción de adrenalina. Por otro lado, la capacitancia celular medida de las células cromafines de rata está entre 5-14 fF (Horrigan y Bookman, 1994). Tomando un valor promedio entre las estimaciones del *pool* liberable de 4000 vesículas (lo que corresponde a 5200 fF), la membrana de estas vesículas representa entre el 40% y el 100% de la membrana celular.

#### ***1.1.4 La médula adrenal y la respuesta al estrés***

El sistema nervioso autónomo es fundamentalmente un sistema eferente e involuntario que transmite impulsos desde el sistema nervioso central (desde centros nerviosos situados en la médula espinal, tallo cerebral e hipotálamo) hasta la periferia, estimulando órganos particulares. Estas acciones incluyen, el control de la frecuencia y la fuerza de contracción cardíaca, la contracción y dilatación de vasos sanguíneos, la contracción y relajación del músculo liso en varios órganos, acomodación visual, tamaño pupilar y secreción de glándulas exocrinas y endocrinas, regulando funciones tan importantes como la digestión, la circulación sanguínea, la respiración y el metabolismo (Purves y col., 2004).

El sistema nervioso autónomo se divide funcionalmente en: sistema simpático y en sistema parasimpático. El sistema simpático juega un papel fundamental en la preservación del organismo, ya que genera una respuesta rápida y efectiva ante los estímulos externos y/o internos que puedan amenazar la integridad del individuo. De esta manera responde a diferentes fuentes de estrés, manteniendo la homeostasis del sistema. Mientras tanto la acción del sistema parasimpático es generalmente opuesta al simpático, y su función está orientada a la conservación de la energía del organismo (Purves y col., 2004).

En el sistema simpático, las fibras preganglionares salen desde la médula espinal y llegan a una serie ganglios intermedios, desde donde parten, las fibras postganglionares que se dirigen al órgano efector. La innervación de la glándula adrenal es una excepción, ya que las fibras preganglionares innervan directamente a la glándula, que sería como ya dijimos previamente un ganglio simpático modificado. El neurotransmisor involucrado en estas sinapsis ganglionares es la acetilcolina, por otro lado el neurotransmisor que es liberado en las sinapsis que se establecen entre las fibras postganglionares y el órgano efector es la noradrenalina (Purves y col., 2004). En la médula adrenal, como ya dijimos, la noradrenalina es mayoritariamente convertida a adrenalina por la enzima feniletanolamina N-metiltransferasa, y dichas sustancias son liberadas a la sangre.

En condiciones normales, en las cuales el organismo no está sometido a estrés, las neuronas preganglionares simpáticas del nervio esplácnico disparan a frecuencias bajas, manteniendo la frecuencia de PA en las células cromafines en aproximadamente ~0,5 Hz. A este estado se lo denomina *breed and feed* (Blandt y col., 1976). En estas condiciones las células cromafines liberan pequeñas cantidades de catecolaminas al sistema circulatorio, que permiten que los parámetros fisiológicos (como por ejemplo el tono vascular y la frecuencia cardíaca) se mantengan en sus niveles de reposo. En condiciones de estrés agudo, debido por ejemplo al ataque de un depredador, el sistema nervioso simpático inicia una respuesta *fight or flight*, en la cual la médula suprarrenal es activada simultáneamente con la rama simpática del sistema nervioso autónomo y actúa en forma sinérgica con éste. La activación de la médula adrenal produce un aumento en la frecuencia de disparo de las células cromafines hasta un valor 30 veces mayor al de reposo (~15Hz) (Iijima y col., 1992), lo cual genera una liberación masiva de adrenalina (en mayor medida) y noradrenalina (en menor medida) a la circulación general. Estas últimas llegan a los órganos blanco y su efecto se suma al de la noradrenalina liberada desde los terminales simpáticos, contribuyendo a la activación de receptores adrenérgicos.

### ***1.1.5 Ventajas como modelo neurobiológico***

Acordes con su origen embriológico, los mecanismos secretorios de las células cromafines poseen muchas similitudes con los de las neuronas, tanto en aspectos moleculares como biofísicos. Ambas células son excitables y la liberación de neurotransmisores o adrenalina se produce a través del disparo de PA que activan CCDV

ubicados en la membrana (Olivera y col., 1994; García y col., 2006), generando un aumento en el  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico y la posterior liberación del contenido vesicular (Augustine y Neher, 1992). Otra característica compartida es que la relación entre el  $\text{Ca}^{2+}$  y la exocitosis no es lineal tanto en la liberación de neurotransmisor (Del Castillo y Engback, 1954) como en la liberación de adrenalina en las células cromafines (Douglas y Rubin, 1961b; Heineman y col., 1993). En cuanto a la maquinaria exocitótica, en las células cromafines se ha descrito la presencia de la gran mayoría de las proteínas involucradas en la secreción que han sido identificadas en zonas activas de las terminales sinápticas (Roth D, Burgoyne RD, 1994 ; Hodel y col., 1994; Morgan y Burgoyne, 1995; Gerber y Sudhof, 2002; Burgoyne RD y Morgan, 2003, Sørensen y col., 2006).

Respecto a las diferencias entre las neuronas y las células cromafines, una muy importante es grado de acople entre estímulo y la secreción. Mientras que en las neuronas los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  y las vesículas están altamente acoplados en zonas activas, permitiendo una rápida y eficiente liberación de los neurotransmisores (Cohen y col., 1991), la secreción de hormonas desde las células cromafines se vierte directamente al torrente sanguíneo, lo cual actúa como paso limitante en el proceso de señalización. De hecho, mayoritariamente, la secreción desde las células cromafines ocurre mucho más lentamente que en las terminales nerviosas (Chow y col., 1992, Chow y col., 1994; Seward y col., 1995). De cualquier modo, frente a una situación de estrés, estas células liberan las catecolaminas en segundos, por lo que el acople estímulo-secreción en estas células puede considerarse una situación intermedia entre neuronas y otras células endocrinas (García A.G. y col., 2006). Es más, como veremos a lo largo de esta tesis, las células cromafines también poseen grupos vesiculares pequeños que pueden ser liberados en forma altamente acoplada con el estímulo en tiempos que no superan unos pocos milisegundos.

En general, las células cromafines poseen características que las hacen muy ventajosas como modelo de experimentación de procesos tales como la exocitosis, la endocitosis, el acople estímulo-secreción, la formación del poro de fusión vesicular, etc. Las células cromafines son fácilmente cultivables (Livett, 1984), en particular los cultivos de células cromafines bovinas son altamente eficientes generando cantidades masivas de células. Además, el tamaño de estas células es marcadamente mayor que la mayoría de las terminales nerviosas y adoptan una geometría esférica en cultivo. Estas características permiten la fácil aplicación de la técnica de *patch clamp* en configuración de célula entera o *whole cell*. Esta técnica, si se utiliza en modo *voltage clamp* permite fijar el potencial de

membrana y registrar las corrientes generadas por el flujo de iones a través de los canales. Debido a la mencionada morfología esférica, estas células se comportan eléctricamente como un compartimiento único, lo que hace más sencillo fijar el potencial de membrana, a diferencia de lo que ocurre con las neuronas que poseen una geometría mucho más compleja. Esta geometría simple también facilita enormemente la aplicación de la técnica de medición de capacitancia como un método para evaluar la exocitosis y la endocitosis con una resolución temporal de mseg (Neher y Marty, 1982). Esta técnica se basa en que las membranas biológicas se comportan eléctricamente como capacitores y por lo tanto la capacitancia celular es directamente proporcional al área superficial de la célula (Gillis, 1995). Por esta razón, la fusión de la membrana vesicular con la membrana plasmática, que se produce en la exocitosis, se traduce en un aumento de la capacitancia y la recuperación de la membrana que se produce por la endocitosis, en una disminución de la capacitancia celular. La técnica de *patch clamp* en la configuración *whole cell* también permite el control de la composición del citoplasma y la adición al mismo vía diálisis por la pipeta de registro, de sondas fluorescentes que permiten la medición de los cambios en la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico. Respecto a este último punto las células cromafines han sido muy utilizadas para estudios de la distribución espacial de las señales de  $\text{Ca}^{2+}$  luego de la activación de los CCDV (Monck y col., 1994; Marengo y Monck, 2000; Marengo y Monck., 2003)

Otra técnica utilizada para estudiar la secreción con alta resolución temporal en células cromafines es la amperometría (Bruns., 2004). Mediante esta técnica se mide la corriente eléctrica generada por la oxidación de las catecolaminas en la superficie de un microelectrodo de fibra de carbono que se coloca en contacto con la superficie celular, pudiéndose detectar las catecolaminas liberadas por las vesículas secretorias individuales (Wightman y col., 1991; Chow y col., 1992). Esta técnica puede ser aplicada conjuntamente con mediciones electrofisiológicas de corrientes y capacitancia celular (Chan y Smith, 2001; Albillos y col., 1997; Ales y col., 1999), a las que podemos sumarle mediciones de señales de  $\text{Ca}^{2+}$  (Robinson y col., 1995; Monck y col., 1994). Otras técnicas aplicadas para estudiar la exocitosis y la endocitosis en células cromafines han sido la obtención de imágenes de fluorescencia a partir de indicadores de tipo FM (Perez Bay y col., 2007) y la aplicación de la técnica de microscopia de reflexión total (TIRFM). Por medio de la técnica de TIRFM es posible visualizar y seguir la evolución de las vesículas a ~100 nm de la membrana plasmática (Steyer y Almers, 2001; Becherer y col., 2007) pudiendo identificar los distintos

modos de fusión así como también diferentes estados de maduración basados en su movilidad (Nofal y col., 2007).

Existen numerosos ejemplos de cómo las células cromafines han servido como modelo neurobiológico. En estas células se logró por primera vez aislar una organela secretoria mediante ultracentrifugación (Blaschko y Welch, 1953). También, se logró establecer por primera vez en estas células que las vesículas secretorias podían almacenar al transmisor en altas concentraciones mediante la actividad de una bomba ATPasa generadora de un gradiente de protones (Njus y Radda, 1978). Además, las células cromafines han sido el modelo fundamental para definir *pools* vesiculares tanto en terminales sinápticas como en células neurosecretoras. Los primeros estudios en 1950s indicaron que las vesículas sinápticas no eran todas funcionalmente idénticas (Liley y North, 1953), pero por las dificultades técnicas debido al tamaño de la presinapsis la clasificación de las vesículas en distintos *pools* fue posible a través de mediciones en células cromafines (Neher y Zucker, 1993, Rettig y Neher, 2002; Sorensen, 2004). Por medio de la aplicación de amperometría, estas células también han servido para definir los distintos tipos de fusión de las vesículas (fusión transitoria o colapso completo). La primera evidencia de la existencia de la fusión transitoria fue obtenida por la medición de capacitancia (Spruce y col., 1990) y amperometría (Zhou y col., 1996) de una vesícula única pero la combinación de ambas técnicas en las células cromafines demostraron que la liberación de la adrenalina coincidía temporalmente con el aumento en capacitancia transitorio demostrando la existencia del este tipo de fusión (Albillos y col., 1997, Ales y col., 1999). En cuanto a la maquinaria exocitótica, en las células cromafines se han identificado las proteínas que conforman el complejo SNARE responsable de la activación de las vesículas para su posterior fusión, por esta razón y por las ventajas experimentales, estas células son un modelo experimental apropiado para estudiar las distintas regulaciones de la formación del complejo SNARE. Por ejemplo para estudiar la función de la SNAP-25 en la formación de este complejo, se expresaron distintos mutantes de esta proteína en el ratón KO y se realizaron mediciones paralelas de capacitancia y amperometría en las células cromafines (Sørensen y col., 2003; Sørensen y col., 2006; Waler y col., 2010).

Por los motivos citados arriba, entre otros, en el pasado y en la actualidad las células cromafines han sido extensamente estudiadas para entender los mecanismos involucrados en la exocitosis, así como también en la endocitosis y en el reciclado de membrana internalizada hacia vesículas liberables.

## ***1.2 Señales de calcio en células cromafines***

La transmisión sináptica y la secreción neuroendócrina está mediada fundamentalmente por la entrada localizada de  $\text{Ca}^{2+}$  desde el medio extracelular a través de los CCDV localizados en la membrana plasmática (Augustine y Neher, 1992). Sin embargo no podemos obviar que las células cromafines poseen otros mecanismos capaces de aumentar el  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico: como ser la liberación desde el retículo endoplasmático (RE) a través de receptores de rianodina y/o de  $\text{IP}_3$ , y la reversión del intercambiador  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  de la membrana plasmática (Pan y Kao, 1997). A su vez poseen varios mecanismos de recaptación de  $\text{Ca}^{2+}$ : la  $\text{Ca}^{2+}$  ATPasa y el intercambiador  $1\text{Ca}^{2+}/3\text{Na}^+$  de la membrana plasmática (Pan y Kao, 1997), una  $\text{Ca}^{2+}$  ATPasa en el RE y la mitocondria (Herrington y col., 1996; Pan y Kao, 1997). Todos estos sistemas pueden potencialmente influir en la distribución espacio-temporal de la señal de  $\text{Ca}^{2+}$  de estas células (Marengo y Monck, 2003).

### ***1.2.1 Fuentes extracelulares de calcio***

#### ***1.2.1.1 Canales de calcio***

Los CCDV son proteínas oligoméricas, constituidos por cinco subunidades:  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$ ,  $\delta$ ,  $\gamma$  y  $\beta$ . La subunidad  $\alpha_1$  es la que forma el poro y es la que distingue a los diferentes tipos de canales de  $\text{Ca}^{2+}$  (Catterall, 2000), mientras las otras subunidades son regulatorias. La subunidad  $\alpha_1$  tiene un tamaño aproximado de 2000 aminoácidos, y mantiene la misma estructura general que los canales de  $\text{Na}^+$  dependientes de voltaje (Tsien y col., 1991); es decir que está constituida por 4 dominios, los que a su vez están formados por 6 segmentos transmembrana. El cuarto de estos segmentos,  $S_4$ , está altamente cargado y por lo tanto actúa como sensor del voltaje (Hille, 2001), mientras que los segmentos  $S_5$  y  $S_6$ , incluido el *loop* entre ellos, contribuyen a la formación del poro del canal. La estructura del canal se esquematiza en la figura 1.4. Los CCDV, como ocurre también para los canales dependientes de voltaje de  $\text{Na}^+$  y de  $\text{K}^+$ , son altamente selectivos para un tipo iónico determinado. Cuando está abierto, el canal forma un poro que se extiende a través de toda la membrana. Este poro es, en casi toda su longitud, mucho más ancho que el ión, salvo en un pequeño tramo donde se encuentra el filtro que establece la selectividad iónica del canal.

Este filtro restringe el paso del ión de acuerdo con el tamaño, carga y energía libre de hidratación del ión (Hille, 3ra edición). La apertura del canal requiere un cambio de conformación de la proteína, que se activa frente a un cambio de potencial (Figura 1.4C).

La dependencia con el voltaje para los CCDV ya fue descrita en el modelo de Hodgkin y Huxley (1952), considerando que cada canal está formado por cierta cantidad de compuertas, donde cada compuerta puede estar en dos estados: abierto o cerrado. Esta dependencia fue introducida asumiendo que la probabilidad dichas compuertas de pasar de un estado de abierto a otro cerrado depende del voltaje de membrana. Si consideramos una compuerta del tipo  $i$ , la probabilidad de dicha compuerta de estar abierta ( $p_i$ ) se obtiene a través de la ecuación diferencial presentada en 1.1.

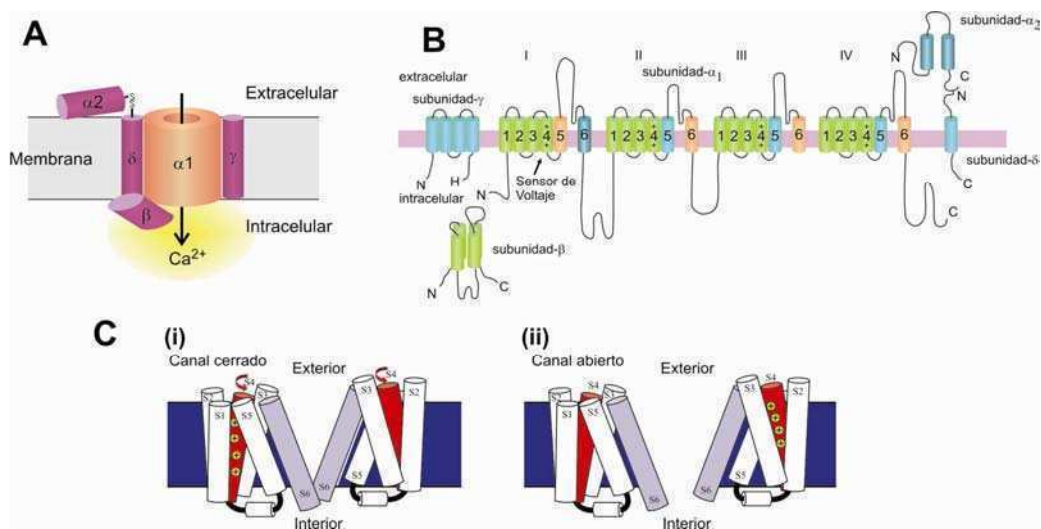
$$\frac{dp_i}{dt} = \alpha_i(V)(1 - p_i) - \beta_i(V)p_i \quad (1.1)$$

Donde  $\alpha_i$  y  $\beta_i$  representan las tasas dependientes de voltaje. Cuando un canal está abierto, (todas las compuertas están en el estado abierto) este contribuye con un valor pequeño ( $\gamma$ ) a la conductancia total de la célula. La conductancia macroscópica ( $g$ ) debida a  $N$  canales constituidos por  $n$  compuertas del tipo  $i$  está dada por la fórmula en la ecuación 1.2.

$$g(V) = \gamma \cdot N \cdot p_i^n(V) \quad (1.2)$$

A nivel celular, la corriente de calcio,  $ICa^{2+}$ , depende del tipo y del número de canales, del gradiente de concentración de  $Ca^{2+}$  entre ambos lados de la membrana y del voltaje al que está sometida la membrana (Hille, 2001). Las corrientes son dependientes del voltaje por dos razones. Por un lado por la dependencia de la probabilidad de apertura del canal con esta variable, y por el otro debido a la fuerza impulsora que actúa sobre estos cationes, la cual es equivalente a la diferencia entre el potencial de membrana aplicado,  $V_m$ , y el potencial de equilibrio del  $Ca^{2+}$  calculado por la ecuación de Nernst,  $E_{Ca^{2+}}$  (Ecuación 1.3).

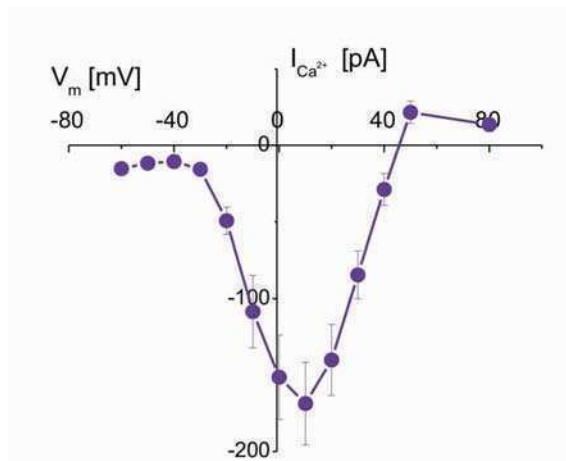
$$I_{Ca^{2+}} = g_{Ca^{2+}} (V_m - E_{Ca^{2+}}) \quad (1.3)$$



**Figura 1.4 - (A)** Diagrama de un canal de  $\text{Ca}^{2+}$  voltaje dependiente. La estructura molecular del canal consta de cinco subunidades:  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$ ,  $\delta$ ,  $\gamma$  y  $\beta$ . La subunidad  $\alpha_1$  es la que distingue a los subtipos de canales y la que contiene al poro. **(B)** Estructura detallada de la subunidad  $\alpha_1$  y las subunidades regulatorias. La subunidad  $\alpha_1$  a su vez está formada por cuatro dominios. En cada uno de ellos hay un sensor de voltaje, S4. **(C)** En la figura se esquematiza el cambio conformacional del canal para pasar del estado (i) cerrado a (ii) abierto.

Las células cromafines sometidas a despolarizaciones sucesivas desde el valor de reposo de la membrana, de -80 mV, hasta potenciales más positivos en forma creciente, muestran primero un aumento en las corrientes de  $\text{Ca}^{2+}$  a partir del umbral de activación que llega a un máximo en aproximadamente +10 mV, en donde la mayoría de los canales están abiertos. Si se aumenta aún más el potencial, la corriente disminuye, porque aún cuando la probabilidad de apertura aumenta, la fuerza impulsora de los iones de  $\text{Ca}^{2+}$  se hace pequeña cuando  $V_m$  se va acercando al potencial de reposo para el calcio,  $E_{\text{Ca}^{2+}}$  (Hille, 2001). Una curva que representa el pico de la corriente en función del voltaje aplicado en la despolarización (curva IV) obtenida experimentalmente en nuestro laboratorio se muestra en la figura 1.5.





**Figura 1.5** - Dependencia de la corriente de  $Ca^{2+}$  con el voltaje en células cromafines de ratón. En esta figura se muestra una curva de la  $I_{Ca^{2+}}$  máxima en función del potencial aplicado durante la despolarización. Esta curva se obtuvo experimentalmente mediante la aplicación de pulsos despolarizantes desde el valor del potencial de holding o mantenimiento ( $-80$  mV) hasta los valores de potencial deseados, los cuales están expresados en la abscisa del gráfico.

Se han identificado distintos tipos de CCDV que difieren en sus propiedades biofísicas y farmacológicas. En principio se distinguieron dos grupos: los que necesitan de una despolarización por voltajes altos para ser activados (*HVA*, *high voltage activated*), y un segundo grupo que se activa por voltajes bajos (*LVA*, *low voltage activated*). El hallazgo de toxinas y/o fármacos específicos que bloquean los canales de  $Ca^{2+}$  permitió una mejor categorización de los mismos. Dentro de los canales *HVA* se pueden distinguir los subtipos: N, P/Q, R y L. La corriente tipo N es bloqueada irreversiblemente por el péptido llamado  $\omega$ -conotoxina-GVIA, proveniente de un caracol marino *Conus geographicus* (Kerr y Yoshikami 1984; Olivera y col. 1985; Kasai y col. 1987; McCleskey y col. 1987). Las corrientes tipo P/Q son bloqueadas con alta especificidad por un componente peptídico del veneno de araña *Agelenopsis aperta* conocido como  $\omega$ -agatoxina-IVA (Mintz 1994), mientras que las de tipo R, por la toxina peptídica SNX-482, aislada del veneno de la tarántula africana *Hysterocrates gigas* (Newcomb y col. 1998). Finalmente, las corrientes denominadas de tipo L son sensibles a las dihidropiridinas (ver Tabla 1.1) (Davies y Zamponi, 2008; García y col., 2006). Los canales del tipo LVA son los llamados de tipo T, estos canales no se expresan normalmente en células cromafines en cultivo, pero se demostró que el subtipo  $\alpha_{1H}$  puede ser reclutado por incubaciones prolongadas en AMP cíclico, o a consecuencia de una estimulación  $\beta$  adrenérgica (Novara y col., 2004), o por exposición a hipoxia (Carbone y col., 2006; del Toro y col., 2003; Carbone y col., 2007). Los nuevos canales que se reclutan

contribuyen a bajar el umbral de excitabilidad y de secreción de catecolaminas (Novara y col., 2004; Giannicopoli y col., 2006). Farmacológicamente, los canales tipo T son más sensibles al bloqueante inorgánico  $\text{Ni}^{2+}$  que a  $\text{Cd}^{2+}$  (Fox, 1987). También se demostró que pueden ser bloqueados por mibefradil (Mishra y Hermismeyer, 1994).

Tipo de Corriente	Subunidad	Activación	Distribución	Farmacología
L	$\text{Ca}_v1.1$	$\alpha_{1S}$	Músculo esquelético	Dihidropiridinas
	$\text{Ca}_v1.2$	$\alpha_{1C}$	Células cromafines, SNC, músculo cardíaco, células endócrinas	
	$\text{Ca}_v1.3$	$\alpha_{1D}$	Células cromafines, SNC, páncreas, riñón, cóclea, oído	
	$\text{Ca}_v1.4$	$\alpha_{1F}$	Retina	
P/Q	$\text{Ca}_v2.1$	$\alpha_{1A}$	Células cromafines, dendritas, terminales nerviosas	$\omega$ -agatoxina-IVA
N	$\text{Ca}_v2.2$	$\alpha_{1B}$	Células cromafines, dendritas, terminales nerviosas	$\omega$ -conotoxina-GIVA
R	$\text{Ca}_v2.3$	$\alpha_{1E}$	Células cromafines, dendritas, terminales nerviosas, cuerpos celulares	SNX-482
T	$\text{Ca}_v3.1$	$\alpha_{1G}$	SNC	Mibefradil
	$\text{Ca}_v3.2$	$\alpha_{1H}$	Células cromafines*, neuronas, músculo cardíaco	
	$\text{Ca}_v3.3$	$\alpha_{1I}$	SNC	

**Tabla 1.1** - Nomenclatura, distribución y farmacología de los distintos canales de  $\text{Ca}^{2+}$  dependientes del voltaje. Los canales tipo T son activados por voltaje bajos (LVA), mientras que el resto de los que se clasifican en la tabla son activados por voltajes altos (HVA). Los subtipos de canales detectados en las células cromafines son los P/Q, L, N y R. (\*) Los canales T no se expresan normalmente en células en cultivo, pero son reclutados en condiciones específicas de estimulación. Esta figura fue modificada de Davies y Zamponi, 2008; García y col., 2006.

### 1.2.2 Fuentes intracelulares de calcio

Las células cromafines poseen varios compartimientos intracelulares capaces de acumular  $\text{Ca}^{2+}$  en su interior. Entre estos tenemos al RE, a la mitocondria, y a las mismas vesículas secretorias. La mitocondria en condiciones fisiológicas, como discutiremos más adelante, no es capaz de acumular  $\text{Ca}^{2+}$  en forma significativa, y de hecho la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  libre intramitocondrial es levemente más alta que la citosólica (Gunter y col., 1994). Por lo tanto esta organela no funciona como una fuente de liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  (Gunter y col.,

1994). Por lo tanto en este capítulo analizaremos fundamentalmente sólo al RE y a las vesículas.

El RE posee una gran capacidad de acumular  $\text{Ca}^{2+}$  por la existencia de una bomba, llamada calcio ATPasa del retículo sarco-endoplásmico o SERCA (Mathiasen y col., 1993). Ésta se localiza en la membrana de dicha organela y transporta el  $\text{Ca}^{2+}$  desde el citosol, contra-gradiente, y con gasto de la energía de enlace del ATP, acumulándolo en el lumen del RE. La presencia de dicha bomba permite la formación de un importante gradiente de  $\text{Ca}^{2+}$  entre el lumen del RE y el citosol ya que la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  basal en ambos compartimentos es del orden de  $\sim 500 \mu\text{M}$  (Montero y col., 1994) y  $\sim 100 \text{ nM}$  (Meldolesi y Pozzan, 1998) respectivamente, lo que habilita a esta organela a ser una potencial fuente de este catión. El RE participa de las señales de  $\text{Ca}^{2+}$  en innumerables tipos celulares, jugando un rol central en la homeostasis del  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico (Endo y col., 1970; Fabiato, 1983; Rigual y col., 2002). El RE posee canales ligando activables que son regulados por mensajeros intracelulares específicos, que permiten la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  al citosol (Berridge, 1993; Berridge, 1997; Inue y col., 2003). Existen dos tipos de canales activados por ligando, los llamados canales activables por inositol 1,4,5-trifosfato o  $\text{IP}_3$  ( $\text{IP}_3\text{R}$ ), cuyo principal activador es  $\text{IP}_3$ , aunque también son regulables por  $\text{Ca}^{2+}$ ; y los receptores de rianodina ( $\text{RyR}$ ). Estos últimos son activados fundamentalmente por  $\text{Ca}^{2+}$ , a concentraciones menores que las necesarias para activar al  $\text{IP}_3\text{R}$ . En consecuencia, un aumento del  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico provocado por la activación de CCDV puede activar por sí solo a los  $\text{RyR}$ , conduciendo a la salida de dicho catión desde el RE, y contribuyendo por lo tanto a un aumento aún mayor del  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico. Es decir que actúa como un mecanismo de amplificación de la señal de  $\text{Ca}^{2+}$ . Este fenómeno, llamado liberación de calcio inducida por calcio, ha sido observado por primera vez en células musculares esqueléticas (Endo y col., 1970), aunque constituye la fuente principal de  $\text{Ca}^{2+}$  en células cardíacas (Fabiato, 1983). En estos modelos experimentales el subtipo L de canales de calcio tiene un rol preponderante en la activación de estos receptores debido a un íntimo acople espacial entre las dos proteínas.

Otra posible fuente de  $\text{Ca}^{2+}$  son las mismas vesículas secretorias. La  $[\text{Ca}^{2+}]$  en las vesículas secretorias es de  $\sim 40 \text{ mM}$  (Winkler y Gesteid, 1980, Hutton, 1989). La mayoría de este  $\text{Ca}^{2+}$  está asociado a la matriz vesicular (cromograninas) y sólo el 10% está libre dentro de la vesícula. La acumulación del  $\text{Ca}^{2+}$  se produce a través de una ATPasa sensible a tapsigargina (Santo Domingo y col., 2008) y la liberación desde las vesículas se observó, en células permeabilizadas, con el agregado de  $\text{IP}_3$  y cafeína (Huh y col., 2005). Algunos

autores sostienen la posibilidad de que el  $\text{Ca}^{2+}$  intravesicular pudiera contribuir a su propia liberación (Santo Domingo y col., 2008), sin embargo la relevancia fisiológica de este  $\text{Ca}^{2+}$  en la exocitosis no ha sido establecido en la bibliografía.

### ***1.2.3 Sistemas de remoción y regulación del calcio citosólico***

Durante el reposo, el  $\text{Ca}^{2+}$  celular se encuentra acumulado a altas concentraciones en el RE, y es bajo en el citosol. La mitocondria, por otro lado, si bien tiene la capacidad de acumular altas concentraciones de  $\text{Ca}^{2+}$ , en condiciones normales sólo alcanzaría valores un poco más altos que los citosólicos (Gunter y Pfeiffer, 1990). Frente a un aumento del  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico por la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  desde las distintas fuentes, la célula debe volver a las condiciones basales (Álvarez J y col., 1999). Las células cromafines poseen diversos mecanismos encargados de remover el  $\text{Ca}^{2+}$  del citosol.

La remoción de  $\text{Ca}^{2+}$  a través de la membrana plasmática se debe a la operación conjunta de una  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasa (estequiometría 1  $\text{Ca}^{2+}$  / ATP) y del intercambiador  $3\text{Na}^+/1\text{Ca}^{2+}$  (Herrington y col., 1996; Pan y Kao, 1997). Estos dos mecanismos funcionando simultáneamente son capaces de disminuir la  $[\text{Ca}^{2+}]$  citosólico a una velocidad máxima de  $\sim 0,2 \mu\text{M/s}$  en células cromafines de rata a  $27^\circ\text{C}$  (Park y col., 1996).

De la tres isoformas de la  $\text{Ca}^{2+}$  ATPasa del RE que existen, en las células cromafines se detectaron dos isoformas de pesos moleculares 116 y 100 kDa que corresponden a los subtipos SERCA 2b y SERCA 3 (Poulsen y col., 1995). Estas ATPasas posee una estequiometría de 2  $\text{Ca}^{2+}$  removidos por ATP hidrolizado (Villalobos y col., 2002), y presenta una velocidad máxima de remoción de  $\text{Ca}^{2+}$  ubicada en un rango entre 1 y  $1,5 \mu\text{M/seg}$ .

En la mitocondria, el  $\text{Ca}^{2+}$  es captado a través de un mecanismo de transportador *uniporter*, que es un sistema de baja afinidad pero de alta capacidad (Gunter y Pfeiffer, 1990). La acumulación del  $\text{Ca}^{2+}$  en esta organela se debe a la fuerza impulsora generada por el potencial de membrana de la mitocondria entre  $-150$  y  $-180 \text{ mV}$ , que puede en ciertas condiciones particulares en general patológicas, promover una importante acumulación de  $\text{Ca}^{2+}$  en la mitocondria, llegando a valores de 5–6 órdenes de magnitud sobre el valor de reposo (Bernardi P., 1999). Este mecanismo de extracción de  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico se observó tanto en células cromafines de rata (Babcock y col., 1997) como de vacas (Xu T y col.,

1997). La velocidad máxima de extracción se calculó en  $\sim 160 \mu\text{M}/\text{seg}$  (Villalobos y col., 2002). La liberación del  $\text{Ca}^{2+}$  acumulado en la mitocondria se produce a través de un intercambiador de  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  (Gunter TE y Pfeiffer DR, 1990; Gunter y col., 1994). La participación de la mitocondria en el metabolismo del  $\text{Ca}^{2+}$  celular no es sólo importante en la regulación del  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico además los cambios transitorios en la  $[\text{Ca}^{2+}]$  intramitocondrial participan en la regulación fina de la respiración (Gunter y col., 1994). Por otro lado, frente a un aumento importante y sostenido del  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico, el aumento consecuente del  $\text{Ca}^{2+}$  intramitocondrial es parte del proceso que desencadena la apoptosis o la muerte celular programada (Gunter y col., 1994; Duchen, 2000).

Finalmente, se debe mencionar que las células cromafines poseen *buffers* endógenos de  $\text{Ca}^{2+}$ , tanto fijos como móviles, que cumplen una función muy importante tanto en la regulación de la intensidad como en la distribución espacial y temporal de las señales de  $\text{Ca}^{2+}$  (O'Sullivan y col., 1989; Zhou y col., 1993; Xu y col., 1997; Marengo y Monck, 2000). Durante la activación de los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  se genera un aumento en la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  cercano a la membrana plasmática que puede alcanzar concentraciones entre  $10 \mu\text{M}$  y  $100 \mu\text{M}$  (Augustine y Neher, 1992; Neher, 1998) que puede ser detectado por mediciones de  $\text{Ca}^{2+}$  fluorescentes (Neher y Augustine, 1992; Marengo y Monck, 2000). La difusión de  $\text{Ca}^{2+}$  hacia el citosol y la presencia de *buffers* aceleran la disipación del gradiente de  $\text{Ca}^{2+}$  restringiéndolo en tiempo y en espacio (Neher, 1998).

Zhou y Neher (1993) midieron la capacidad de *buffers* endógenos para ligarse al  $\text{Ca}^{2+}$  en las células cromafines mediante el agregado de un sensor fluorescente del  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular (Fura2) en la configuración de *patch* perforado. En esta configuración se producen pequeños agujeros en la membrana que no permiten la pérdida de las proteínas solubles (Horn y Marty, 1988). En la transición a la configuración *whole cell* se observó una disminución de entre un 20-50% en la capacidad del *buffers* después de 2-5 minutos indicando la pérdida de *buffers* móviles solubles en el rango de 7-20 kDa. Los *buffers* remanentes, muy poco solubles o fijos, mostraron una capacidad de entre 40-90 con una afinidad ( $K_d$ ) de  $100 \mu\text{M}$  (Augustine y Neher, 1992; Zhou y Neher, 1993). En otro trabajo en el que se utilizaron imágenes de laser pulsado y un modelo que incorpora la difusión del  $\text{Ca}^{2+}$  y el ligado a los *buffers* intracelulares para simular los gradientes de  $\text{Ca}^{2+}$ , mostraron que el valor de la afinidad del *buffer* fijo endógeno pueden ser mucho más baja, con un valor de  $1 \mu\text{M}$  y una capacidad de 1000 (Marengo y Monk, 2000). A partir de las mediciones experimentales de las propiedades para el *buffer* endógeno fijo se propusieron algunas

proteínas candidatas. Entre las proteínas propuestas están la calmodulina y la calbindina, ambas proteínas fueron identificadas en las células cromafines (Buffa y col., 1989; Hikita y col., 1984). La calmodulina es una proteína que se encuentra en todas las células eucariotas. Esta proteína tiene dos sitios de baja afinidad por el  $\text{Ca}^{2+}$  con  $K_d$  entre 10-100  $\mu\text{M}$  (Weinstein y Mehler, 1994). En cuanto a la calbindina existen dos tipos diferenciadas por su peso molecular, la calbindin-D28K y la calbindina-D9K. La calbindina-D9K tiene un  $K_d$  de 10  $\mu\text{M}$  (Forsen S y col., 1988; Linse y col., 1991) y la calbindina-D28K tiene un  $K_d$  por el  $\text{Ca}^{2+}$  de 0,5  $\mu\text{M}$  (Bredderman y Wasserman, 1974).

#### ***1.2.4 Características espaciales y temporales de las señales de calcio***

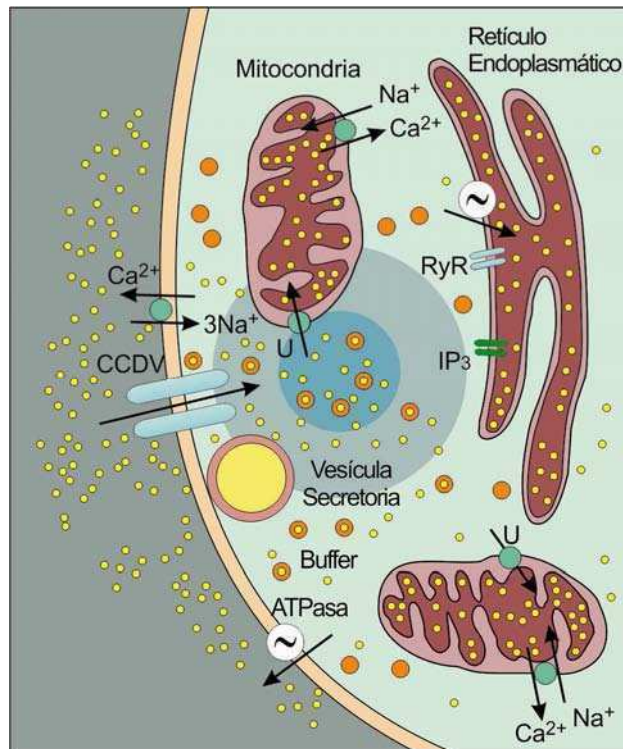
Todos los elementos descriptos (canales, compartimientos intracelulares, *buffers*, sistemas de remoción) modulan la señal transitoria de la  $[\text{Ca}^{2+}]$  citosólico. Sin embargo, como ya habíamos mencionado previamente, la señal relevante de  $\text{Ca}^{2+}$  para la exocitosis es la que ocurre próxima a la membrana plasmática, que se produce gracias a la activación de los CCDV, y es modulada por los *buffers* presentes en el citosol (Marengo y Monck 2000). Usando sensores fluorescentes de  $\text{Ca}^{2+}$  iluminados por un laser pulsado en células cromafines bovinas, se ha observado que los gradientes de  $\text{Ca}^{2+}$  se manifiestan rápidamente ( $<5$  mseg) después de una despolarización breve y se disipan en varios mseg después de la repolarización (Monck y col., 1994; Marengo y Monck, 2000). Resultados similares fueron obtenidos en células bovinas y de ratón usando la técnica de microscopia de escaneo lineal (Alés y col., 2005). La distribución del  $\text{Ca}^{2+}$  puede ser simplemente explicada por la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$ , el ligado a *buffers* y la difusión de  $\text{Ca}^{2+}$  y *buffers* (Marengo y Monck, 2000; Marengo y Monck 2003). La comparación de la cantidad total de  $\text{Ca}^{2+}$  que ingresa al citosol, medida por la integral de la corriente de  $\text{Ca}^{2+}$ , con el cambio de la  $[\text{Ca}^{2+}]$ , obtenida del promedio espacial de la fluorescencia, muestra que la mayoría del  $\text{Ca}^{2+}$  no está disponible en el citosol en su forma libre. De hecho sólo el 0,1% del  $\text{Ca}^{2+}$  que ingresa a la célula está libre en el citosol, y la mayoría del  $\text{Ca}^{2+}$  está ligado a los *buffers* citosólicos. Los gradientes de  $\text{Ca}^{2+}$  inducidos por despolarizaciones breves (50 mseg) no reciben contribución de la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  desde el RE (ya sea inducida por  $\text{Ca}^{2+}$  o por  $\text{IP}_3$ ) (Marengo y Monck, 2003). Más aún, la inhibición farmacológica de los transportadores de  $\text{Ca}^{2+}$  activos de la mitocondria y en el RE, o la supresión del intercambiador de  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ , no producen efectos en los cambios de la  $[\text{Ca}^{2+}]$  o en la velocidad de disipación (Marengo y Monck, 2000), sugiriendo que los *buffers* de  $\text{Ca}^{2+}$  endógenos pasivos son los responsables

de la lenta redistribución del  $\text{Ca}^{2+}$ . Resultados similares se observaron frente a una estimulación de trenes de PA a baja frecuencia, en los cuales los mecanismos que determinan la forma de la señal de  $[\text{Ca}^{2+}]$  citosólico son principalmente, la corriente de  $\text{Ca}^{2+}$ , la velocidad de difusión del  $\text{Ca}^{2+}$  y el ligado del catión a los *buffers* citosólicos (Vega y col., 1995; Villalobos y col., 1992).

Después de la disipación del gradiente de  $\text{Ca}^{2+}$ , la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  permanece uniformemente elevada y luego retorna lentamente a su valor basal (Marengo y Monck, 2003). Este proceso se lleva a cabo por sistemas de transporte en los cuales la mitocondria parece tener un papel importante en las células cromafines, además también habría participación de la ATPasa del RE, el intercambiador de  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  y de la bomba de la membrana plasmática (Herrington y col., 1996; Ales y col., 2005; Villalobos y col., 2002; Marengo, 2005; Marengo y Monck, 2003; Pan y Kao, 1997; Xu y col., 1997; Tang y col., 2000). En particular, es sabido que la inhibición de la mitocondria y del intercambiador de  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  prolonga marcadamente el transitorio de  $\text{Ca}^{2+}$  y en consecuencia provoca un aumento en la secreción (Tang y col., 2000; Ales y col., 2005).

Es esperable que la señal de  $\text{Ca}^{2+}$  próxima a la membrana producida por la apertura de CCDV no sea uniforme. La entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  por los canales es naturalmente discontinua espacialmente, y se espera que se forme micro o nanodominios de  $[\text{Ca}^{2+}]$  altas alrededor de los canales de  $\text{Ca}^{2+}$ . Esto es particularmente importante, porque las vesículas secretorias pueden distribuirse más cerca o más lejos de los sitios de entradas de  $\text{Ca}^{2+}$ , y en consecuencia tienen diferente probabilidad de liberación. Estudios de modelado predijeron que las concentraciones micromolares se producen en las zonas adyacentes de los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  (Simon y Llinas, 1985), y la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  alcanza los niveles de reposo a por lo menos 300 nm de la boca del canal (Chad y Eckert, 1984). Hay evidencias experimentales que avalan esta hipótesis. Usando la técnica de laser pulsada Monck y colaboradores (1994) midieron la generación de *hotspots* de  $\text{Ca}^{2+}$  en la periferia de la célula en respuesta a pulsos despolarizantes (Monck y col., 1994). Además en experimentos combinando la técnica de imágenes por laser pulsado con amperometría se lograron mapear los sitios de entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  y exocitosis simultáneamente. Estos experimentos confirmaron la presencia de *hotspots* de  $\text{Ca}^{2+}$  provocados por despolarizaciones de corta duración, los cuales colocalizaron con los sitios de liberación de adrenalina (Robinson y col., 1995; Monck y col., 1994). Usando microscopia de campo evanescente para medir la  $[\text{Ca}^{2+}]$  cercano a la membrana, Becherer y col., (Becherer y col., 2003) pudieron medir un

microdominio único asociado a la activación de CCDV. Estos microdominios están localizados en una capa fina a 200 nm de la membrana plasmática, una región donde se localizan las vesículas ancladas.



**Figura 1.6** - En la figura se muestran los mecanismos involucrados en la formación y regulación de la señal de  $\text{Ca}^{2+}$ . En resumen, el  $\text{Ca}^{2+}$  que ingresa por los CCDV es el responsable fundamental de la exocitosis de las vesículas secretorias. Este mismo  $\text{Ca}^{2+}$  puede potencialmente inducir la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  por los RyR del RE. La liberación desde el RE también puede producirse por los IP<sub>3</sub>R. Los sistemas de remoción del calcio citosólico son: La mitocondria que capta este catión por el uniporter (U), los mecanismos de extrusión a través de la membrana plasmática, que se deben a la operación conjunta de una  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasa y del intercambiador de  $\text{Na}^{+}/\text{Ca}^{2+}$ , y finalmente la  $\text{Ca}^{2+}$  ATPasa del RE. Finalmente los buffers en el citosol regulan la intensidad y la extensión de la señal de  $\text{Ca}^{2+}$  (Figura adaptada de García y col., 2006).

Esta visión es difícil de reconciliar con la función fisiológica de estas células (Lagnado y col., 2010), que liberan hormonas al torrente sanguíneo. Mientras que en las sinapsis las vesículas se fusionan muy rápidamente a  $< 1$  mseg después de la apertura del canal en respuesta de un PA (Robitaille y col., 1990; Cohen y col., 1991), en las células



neuroendócrinas la fusión puede llegar a ser 100 veces más lenta (Almers, 1990; Wu M. y Llobet A., 1994; Zhou y Misler, 1995). Sin embargo, como veremos a lo largo de esta tesis, las células cromafines poseen grupos de vesículas altamente acopladas al estímulo que se liberan muy rápidamente.

### ***1.3 Exocitosis en células cromafines***

La exocitosis es el proceso de fusión de una vesícula lipídica intracelular a la membrana plasmática, que puede involucrar la secreción al espacio extracelular de diferentes tipos de moléculas contenidas en dichas vesículas. Este proceso está presente, en todas las células eucariotas y se genera a través de mecanismos muy conservados. Todas las células presentan una exocitosis de tipo constitutiva, que forma parte del normal reciclado de lípidos y proteínas entre la membrana plasmática y el interior de la célula. Esta exocitosis constitutiva es activa a los bajos niveles de  $\text{Ca}^{2+}$  del citosol en la célula en reposo (Jahn y col., 2003, Sorensen, 2004). Por otro lado, la secreción de mensajeros químicos como neurotransmisores u hormonas, que se observa tanto en terminales nerviosas como en células endocrinas y neuroendocrinas, depende en cambio de una exocitosis finamente regulada por la concentración del  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico, el cual debe superar ciertos valores críticos para activarla. Por lo tanto, para disparar este mecanismo es necesaria la elevación del  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular, la cual se produce fundamentalmente como consecuencia de la apertura de los CCDV, fisiológicamente activados ante la propagación de PA (Augustine y Neher, 1992). Si bien las exocitosis constitutiva y la regulada por  $\text{Ca}^{2+}$  cumplen funciones distintas, los pasos que deben cumplir las vesículas antes de fusionarse son los mismos en ambos casos.

El primer paso que se debe cumplir para que una vesícula pueda fusionarse es el *docking* o anclado, en el cual las vesículas se aproximan a la membrana plasmática estableciendo algún tipo de contacto con ésta. La definición de este proceso presenta contradicciones en la literatura, ya que algunos autores aplican definiciones morfológicas, y otros definiciones a nivel molecular. Las primeras se basan en estudios de microscopía electrónica y se refieren a las vesículas que se encuentran próximas a la membrana plasmática, a una distancia inferior a 200 nm (Ashery y col., 2000). Sin embargo, dado que las células cromafines poseen una enorme cantidad de vesículas, parecería que esta definición es muy poco

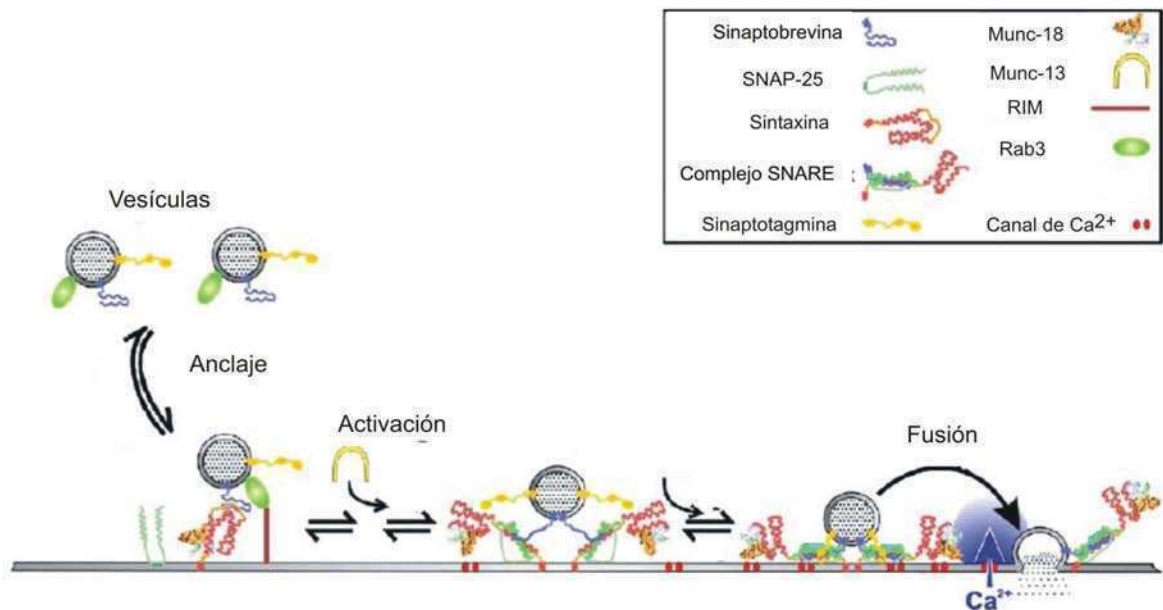
precisa e involucraría una población muy heterogénea de vesículas. Otros autores definen que las vesículas ancladas son aquellas en las que ciertas proteínas vesiculares interactúan con otras de la membrana plasmática, aunque no existe consenso sobre cuáles serían dichas proteínas. En algunos trabajos se postuló que la sinaptotagmina, la syntaxina y la neurexina1 intervendrían en el anclado (Pevsner y col., 1994). Mientras que trabajos más recientes, utilizando ratones transgénicos, aportaron evidencias que sugieren que la Munc18 y la syntaxina serían también firmes candidatos para este proceso (Sorensen y col., 2003; Borisovska y col., 2005) (Figura 1.7). De hecho, la delección de Munc18 induce una gran reducción del número de vesículas ancladas a la membrana y una pérdida total en la secreción en células cromafines (Voets y col., 2001a) y en células de la hipófisis (Korteweg y col., 2005). Otras proteínas que estarían involucradas en el anclado de las vesículas a la membrana son la Rab3 y la proteína RIM (*Rab3-interacting molecule*) (Sudhoff, 2004). Las proteínas Rabs son pequeñas GTPasas que se ligan a la membrana de las vesículas secretorias mediante grupos hidrofóbicos ubicados en el C terminal. La Rab3 se expresa en el cerebro, asociada a vesículas sinápticas (Schluter y col., 2002) y en las vesículas secretorias de las células cromafines (Lin y col., 1997). La proteína Rab3A, en su forma unida a GTP se inserta en la membrana vesicular y reconoce a la proteína RIM en la membrana plasmática (Jahn y col. 2003; Dulubova y col., 2005; Schoch y Gundelfinger 2006). En particular, en células cromafines, se reportó que Rab3 promueve el anclado de las vesículas a la membrana plasmática (Van Weering, y col., 2007).

Luego del anclaje, las vesículas secretorias deben atravesar un proceso de activación (o *priming*) (Figura 1.7). En este proceso las vesículas ya ancladas adquieren la capacidad de fusionarse frente a una señal de  $\text{Ca}^{2+}$  apropiada. El *priming* es un proceso complejo que involucraría varios pasos, y que según el consenso general requiere ATP (Holz y col., 1989; Xu y col., 1998). Este proceso lleva finalmente a formación/maduración del complejo SNARE (por *soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptors*), que es el complejo proteico involucrado en la fusión. La formación del complejo SNARE implica la interacción entre proteínas de la membrana plasmática (t-SNARE) y de la membrana vesicular (v-SNARE) (Jahn y Sudhof 1999; Brunger 2001; Chen y Scheller 2001; Bruns y Jahn, 2002; Rizo y Sudhof, 2002; Fasshauer, 2003). En sinapsis y en células neuroendocrinas, el v-SNARE es la synaptobrevina, la cual forma un complejo estable con las t-SNAREs, SNAP-25 y syntaxina, que se ubican en la membrana plasmática. La cristalización del complejo SNARE reveló la existencia de cuatro  $\alpha$  hélices, una de syntaxina,

una de sinaptobrevina y dos de SNAP-25 (Sutton y col., 1998) (Figura 1.8). Diversas proteínas accesorias están involucradas en la regulación, reciclado, y/o formación del complejo SNARE, como NSF, SNAP, Munc13, Munc18 y otras.

Una de las primeras etapas del *priming* consiste en el reciclado de los complejos SNARE que han sido ya utilizados. Este es un proceso dependiente de ATP en el que intervienen las proteínas NSF y SNAP. La NSF es una chaperona que utilizando la energía de hidrólisis del ATP y utilizando a SNAP como cofactor catalizaría el proceso que promueve el desarmado de los complejos SNARE que quedan en conformación CIS (en el mismo lado de la membrana plasmática) luego de un proceso de exocitosis previo. Esto permitiría la reutilización de las proteínas SNARE en un nuevo proceso de fusión (Sollner y col., 1993; Kibble y col., 1996). Luego de este proceso ATP dependiente, intervienen en la activación otros procesos en los que participaría el  $\text{Ca}^{2+}$ , Munc18, Munc13 y otras proteínas (Sorensen y col., 2003; Borisovska y col., 2005). Por mencionar un ejemplo se postula que munc13 favorecería el paso de la syntaxina desde una conformación cerrada a una abierta, necesaria para la formación del complejo SNARE (Sassa y col., 1999).

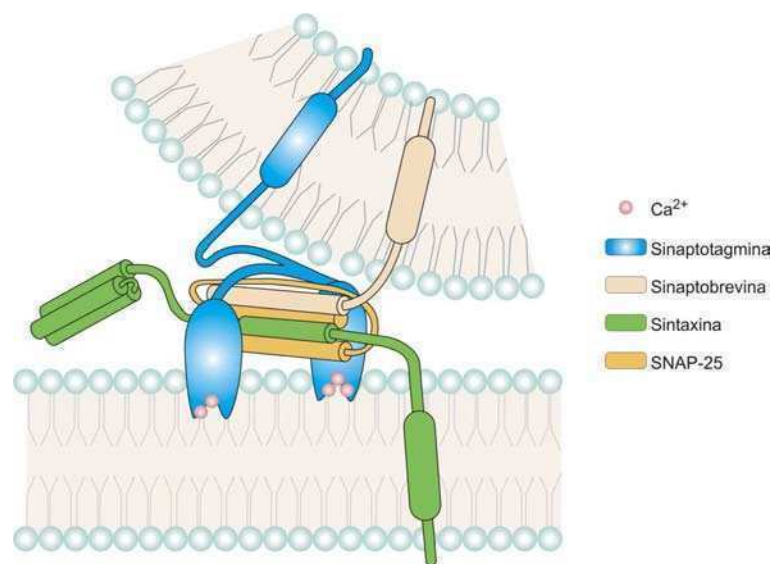
Durante la activación o *priming* ocurren diversos eventos que conducen finalmente a la ubicación y alineación de las proteínas del complejo SNARE, favoreciendo la interacción de los componentes entre sí. El complejo así formado sufre un proceso activo desde el punto de vista energético llamado *zippering*, el cual conduce a la formación de un estado *coil coiled* entre las distintas alfa hélice que forman el SNARE, empezando desde el N terminal y terminando en el C terminal (Borisovska y col., 2005, Sorensen y col., 2006). Esto lleva a la aproximación de una membrana con la otra (Figura 1.7), reduciendo así la energía de activación necesaria para la fusión, que es de por sí un proceso espontáneo (Jahn y col., 2003). La aproximación íntima de las membranas aumenta marcadamente la probabilidad de fusión entre ambas llevando a formación de un poro de fusión (Xue Han y col., 2004), que se establece entre los medios extracelular e intracelular. Este proceso se realiza en dos pasos: primero las membranas se aproximan, venciendo las fuerzas electroestáticas y luego se desestabilizan las porciones hidrofílica e hidrofóbica de la bicapa lipídica. Todas estas transiciones están gobernadas por fuerzas que minimizan la exposición de superficies no polares al medio acuoso (Kozlov y Markin, 1983; Chernomordik y col., 1987).



**Figura 1.7** - Diagrama modificado de Becherer y Rettig, 2006 en el que se representan los pasos de la exocitosis y las distintas proteínas involucradas en cada paso. En el anclaje, la vesícula se posiciona próxima a la membrana debido al efecto de interacciones proteicas, entre las cuales estarían involucradas la GTPasa Rab3, RIM, Munc 18 y syntaxina. En la activación, las vesículas experimentan una serie de procesos que las prepara para ser exocitadas frente a una señal de Ca<sup>2+</sup> apropiada. En esta etapa ocurrirían una serie de reacciones que contribuyen a la activación de las proteínas v-SNARE (sinaptobrevina) y las proteínas t-SNARE (SNAP 25 y syntaxina), y a la consecuente alineación de las mismas. En la exocitosis regulada, ante el incremento de la concentración citosólica de calcio, en este caso debido a la entrada del catión a través de canales de membrana, se produce un cambio conformacional en las proteínas del complejo SNARE. Esto lleva a que la interacción entre las mismas pase de ser débil a fuerte, conduciendo a la aposición y aproximación de las membranas vesicular y plasmática que finalmente generan del poro de fusión.

En el caso de la exocitosis regulada por Ca<sup>2+</sup>, los eventos de anclaje y activación son etapas necesarias para que las vesículas alcancen el estado de maduración final para poder estar preparadas para fusionarse. Sin embargo, la fusión vesicular ocurrirá solamente con alta probabilidad cuando el aumento citosólico de Ca<sup>2+</sup> supere cierto valor umbral (1-10  $\mu$ M) en la región próxima a las vesículas (Sugita, 2008). En estos casos particulares la fusión requiere, además de la presencia de las proteínas SNARE, de la existencia de un sensor de Ca<sup>2+</sup>. Existe ya un alto grado de aceptación que la familia de las sinaptotagminas es la que

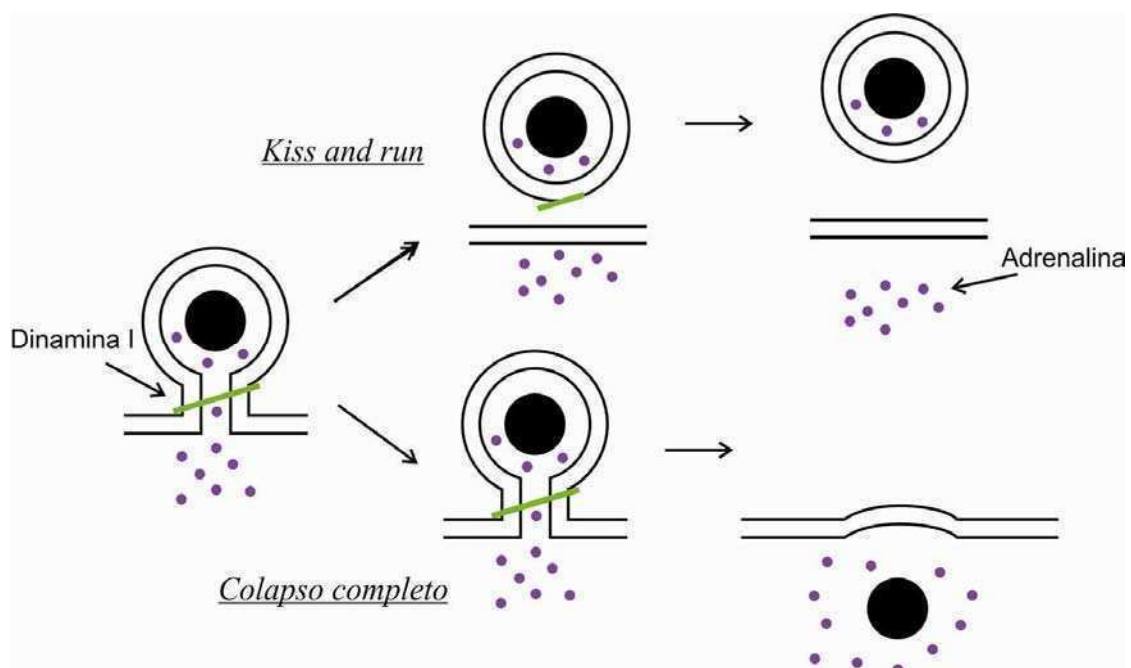
cumple esta función (Perin y col., 1990). En particular para la exocitosis rápida asociada a terminales sinápticas (Geppert y col., 1994) y aparentemente también para las vesículas liberables de las células cromafines (Voets y col., 2001), el candidato es la sinaptotagmina-1. En general, la sinaptotagmina es una proteína vesicular que posee cuatro sitios de unión a iones  $\text{Ca}^{2+}$ , que al ser ocupados por el ión, llevan a la activación de la proteína favoreciendo la unión de esta a la syntaxina (Bennett y col., 1992) y a ciertos lípidos de la cara interna de la membrana plasmática (Brose y col., 1992) (Figura 1.8). Esto, juntamente con el *zippering* (Sutton y col., 1998) del complejo SNARE, llevaría a la formación del poro de fusión (Sugita, 2008). La finalización de este proceso conduce a la liberación del contenido vesicular, ya sea a la brecha sináptica (en el caso de neuronas) o a la circulación sanguínea (en el caso de las células neuroendócrinas).



**Figura 1.8** - Esquema del complejo SNARE. El complejo SNARE está formado por la proteína vesicular sinaptobrevina (v-SNARE) y dos proteínas localizadas en la membrana plasmática, la syntaxina y SNAP-25 (t-SNARE). La syntaxina y la sinaptobrevina aportan sólo un segmento, mientras que el SNAP-25 aporta dos. La sinaptotagmina es una proteína vesicular que funciona como sensor de  $\text{Ca}^{2+}$ . Esta proteína se une a fosfolípidos de membrana plasmática y a la syntaxina de forma dependiente de  $\text{Ca}^{2+}$ .

Una vez abierto el poro de fusión la exocitosis puede seguir caminos diferentes. Estos pueden llevar al colapso completo de la vesícula con la membrana plasmática o a un proceso de fusión transitoria (Figura 1.9). En el primer caso el poro de fusión se expande llevando a una integración total de la membrana vesicular con la membrana plasmática. En

cambio, en una fusión transitoria el poro de fusión permanece abierto durante un cierto tiempo, y luego vuelve a cerrarse, llevando a que la vesícula se recupere en el mismo sitio de fusión sin perder su identidad. A este proceso de exocitosis/endocitosis acopladas se la denomina generalmente *kiss and run*. Sin embargo varios autores han definido diferentes tipos de fusión transitoria de acuerdo al tiempo de apertura, conductividad y grado de selectividad del poro, como es el *kiss and run* propiamente dicho, el *stand alone foot* y la *cavicapture* (Cárdenas y Marengo, 2010).



**Figura 1.9** - Representación en la que se muestra la secuencia de eventos del mecanismo de *kiss and run* y *colapso completo*. Luego de la formación del poro de la vesícula puede recuperarse sin haber perdido su identidad (*kiss and run*) o llegar al *colapso completo*. Figura modificada de Chan y col., (2010).

#### **1.4 La cinética de la respuesta secretoria y su asociación con los grupos de vesículas**

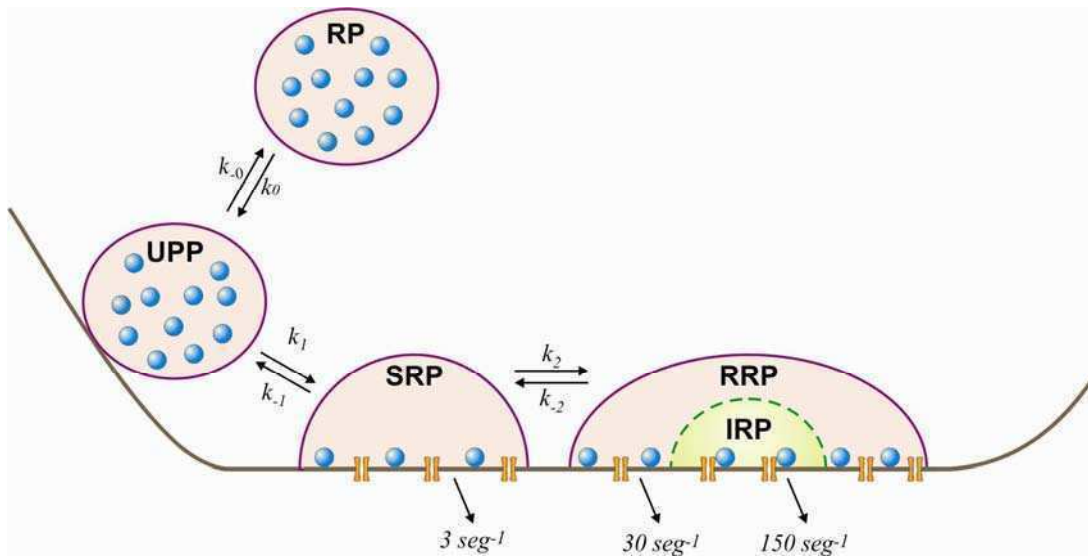
Desde el momento en que es formada hasta que es liberada, una vesícula debe pasar por muchas etapas, comenzando con la biogénesis de la vesícula en el Golgi, siguiendo con su transporte por el citoesqueleto, luego su llenado con sustancias activas a través de

transportadores específicos, su disociación del citoesqueleto, el anclado físico a la membrana plasmática y finalmente su activación (Bittner y col., 1992; Neher E. y Zucker RS, 1993). Esta compleja secuencia de procesos hace que en la célula cromafin se establezcan *pools* vesiculares que se encuentran en distintas etapas de maduración. Para evidenciar la existencia de estos *pools* vesiculares es necesario en primer lugar disparar la exocitosis celular con una concentración homogénea de  $\text{Ca}^{2+}$ , de modo que no se generen diferencias de respuesta asociadas a la distribución espacial de las vesículas. En segundo lugar se debe utilizar una técnica de registro de la exocitosis de alta resolución temporal, que permita diferenciar los *pools* maduros de los inmaduros. La técnica llamada *flash photolysis* de  $\text{Ca}^{2+}$  enjaulado permite obtener una señal de  $\text{Ca}^{2+}$  uniforme espacialmente. Esta técnica consiste en ingresar un *buffer* de  $\text{Ca}^{2+}$  fotosensible al citoplasma con  $\text{Ca}^{2+}$  unido al mismo, y por un pulso de luz modificar químicamente a la molécula del *buffer*, que rápidamente disminuye mucho su afinidad por este catión, y en consecuencia lo libera (Kaplan y Ellis Davies, 1988). Por otro lado, la medición de la capacitancia celular por medio de la técnica de *patch clamp* en configuración *whole cell* tiene la resolución espacial necesaria para este tipo de experimentos (Neher y Marty, 1982).

Los experimentos realizados con la técnica descrita en el párrafo previo en células cromafines muestran la aparición de dos componentes claramente diferenciables cinéticamente en el aumento registrado en la capacitancia celular: uno rápido que se completa en menos de un segundo y al cual se lo denomina *exocytotic burst*, y otro lento y sostenido que evoluciona por muchos segundos (Heinemann y col., 1994). Mientras que el primero fue asociado a vesículas preparadas para liberarse, que han ya experimentado el anclado y la activación, al segundo se lo considera la manifestación cinética de un *pool* de reserva (RP, *reserve pool*), compuesto por vesículas inmaduras. El RP representa el *pool* más grande en las células cromafines que contiene entre 2000-5000 vesículas (Sorensen, 2004; Heinemann y col., 1994). Se ha determinado que el RP se compone mayormente de vesículas no ancladas a la membrana y de una menor fracción de vesículas ya ancladas, a la que se denominó UPP (*unprime pool*), es decir un grupo de vesículas que ya se han anclado pero que aún no se han activado (Ashery y col., 2000). La existencia de este último *pool* se evidenció a partir de la comparación del tamaño del *pool* de reserva, calculado por mediciones de capacitancia, con el número de vesículas ancladas morfológicamente a la membrana plasmática, observado por microscopia electrónica (Ashery y col., 2000).

Mediciones con mayor resolución permitieron identificar dentro del *exocytotic burst* dos componentes exponenciales, que se interpretaron como la existencia de dos grupos de vesículas con distintas cinéticas de liberación. Uno rápido, al cual se llamó *pool* de vesículas preparadas para liberarse (RRP, *ready releasable pool*) y otro más lento al que se denominó SRP (*slowly releasable pool*) (Heinemann y col., 1994; Voets y col., 1999). Las diferencias a nivel molecular entre las vesículas que componen a estos dos grupos no ha sido resuelta hasta el momento, pero se piensa que podrían responder a sensores de  $\text{Ca}^{2+}$  diferentes (Voets, 2000; Voets y col., 2001). Como el llenado del RRP se corresponde con un vaciamiento del SRP (Voets y col., 1999), se piensa que estos dos grupos vesiculares se ubicarían secuencialmente (Heinemann y col., 1994; Voets y col., 1999; Sorensen, 2004). El tamaño del SRP y del RRP corresponden a ~130 -150 vesículas cada uno (Voets y col., 1999; Becherer y Rettig, 2006). Estos dos *pools* (SRP y RRP) serían rellenados desde el *pool* de vesículas ancladas pero no activadas, es decir el UPP. Pese a los importantes avances que produjo la aplicación de la técnica de *flash photolysis* de  $\text{Ca}^{2+}$  enjaulado para la determinación de *pools* vesiculares esta técnica no permite diferenciar a las vesículas de acuerdo a su distancia con la fuente de  $\text{Ca}^{2+}$  fisiológica. Podemos imaginar que fisiológicamente hablando, dado que el  $\text{Ca}^{2+}$  proviene de fuentes puntuales, este aspecto puede ser muy importante en cuanto a la determinación de diferencias en la probabilidad de experimentar exocitosis entre las vesículas ya maduras. Por ejemplo, se ha calculado que las vesículas más cercanas a los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  deben experimentar necesariamente una  $[\text{Ca}^{2+}]$  mucho más alta que las vesículas distantes cuando dichos canales son activados (Neher, 1998). Por lo tanto, tales vesículas se deberían liberar más rápidamente frente a un estímulo adecuado. Cuando se indujo la liberación del RRP por a un tren de despolarizaciones cortas, o por despolarizaciones individuales de duración creciente, se ha logrado identificar un *pool* de vesículas altamente acoplado al estímulo dentro del RRP. A este *pool* se lo denominó *pool* inmediatamente liberable (IRP; *immediately releasable pool*) (Horrigan y Bookman, 1994; Voets y col., 1999). Este pequeño grupo, con aproximadamente 20 vesículas (~25% del RRP), tiene una tasa de liberación 5 veces mayor que las del RRP (Figura 1.10). Este *pool* de vesículas es el objeto de estudio en esta tesis, y por lo tanto será descrito con mayor detalle en un capítulo posterior. Los distintos *pools* descriptos se observan en la figura 1.10 (Heinemann y col., 1994; Smith y col., 1998; Voets y col., 1999; Sorensen, 2004). Las reacciones descriptas en la figura con flechas pueden simbolizar tanto una relocalización espacial de las vesículas como un paso de maduración que no implique un traslado a nivel espacial.





**Figura 1.10** - Diferentes pools de vesículas identificados. Las vesículas pueden ser clasificadas en distintos pools dependiendo de su estado de maduración o su distribución espacial. En los experimentos de flash photolysis se observa que dentro de la respuesta exocitótica inicial, exocytotic burst, hay dos conjuntos de vesículas con distintas cinéticas. La respuesta más rápida, se asocia al RRP y la más lenta al SRP. Dentro del primero se diferencia un conjunto de vesículas que se encuentra más acoplado al estímulo por su proximidad a los canales de  $\text{Ca}^{2+}$ , que se denomina IRP. El pool UPP está compuesto por las vesículas ancladas en la membrana pero que no han sido activadas y por último el RP por vesículas inmaduras que se encuentran alejadas de la membrana. Adaptado de Ashery y col. (2000) y Voets y col. (1999).

## 1.5 EL IRP

El IRP fue descrito por primera vez por Horrigan y Bookman (1994) en cultivos de células cromafines de rata (Tabla 1.2). Estos autores midieron los cambios de capacitancia de la membrana celular en respuesta a despolarizaciones de corta duración, entre 5 y 100 mseg, y observaron que cuando la duración del estímulo era menor de 30 mseg, la totalidad de exocitosis ocurría durante la despolarización, y que finalizada esta, la capacitancia de la membrana se mantenía estable. Por lo tanto, los autores postularon la existencia de un pequeño pool de vesículas, que se libera durante pulsos breves, en períodos de pocas decenas de milisegundos. A partir de la medición de los cambios de capacitancia producidos por pulsos despolarizantes entre 5 y 100 mseg definieron un IRP de 34 fF (17 vesículas), cuya liberación sigue un comportamiento cinético de primer orden, con una tasa inicial de

680 fF/s y una constante de tiempo de 50 mseg. Los mismos autores demostraron que el uso repetido de despolarizaciones más largas o trenes evocaban la activación de un componente más lento y más grande de la exocitosis, que fue atribuida a la fusión del RRP, el cual aparecía luego de un retardo y posteriormente a la liberación de IRP.

Horrigan y Bookman (1994) propusieron dos posibilidades alternativas para explicar sus resultados:

(1) IRP podría reflejar una población de vesículas que sea funcionalmente distinta de las vesículas secretorias que componen el RRP.

(2) IRP + el RRP representarían una población homogénea de vesículas con la misma probabilidad de liberación, pero diferenciadas por su proximidad a los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  (Figura 1.10).

En el último caso, el IRP consistiría un subconjunto de vesículas listas para liberarse que se localizan cerca de los canales de  $\text{Ca}^{2+}$ , y que por lo tanto detectarían una concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  mayor que el resto del RRP. Esta última posibilidad fue apoyada por resultados obtenidos con la técnica *flash photolysis de  $\text{Ca}^{2+}$  enjaulado*. En estos experimentos no se observó un componente cinético más rápido que el correspondiente al RRP, como se esperaría observar si las vesículas del IRP constituyeran un grupo vesicular intrínsecamente diferenciado de RRP con mayor probabilidad de fusionarse. A partir de estos experimentos se concluyó que frente a una señal de  $\text{Ca}^{2+}$  homogénea estas vesículas tendrían igual probabilidad de fusionarse que las del RRP, y por lo tanto estarían incluidas en este grupo. Se postuló que debido a su mayor proximidad con los canales de  $\text{Ca}^{2+}$ , lograrían fusionarse más rápidamente cuando la exocitosis es disparada por la activación de CCDV (Voets y col., 1999; Ashery y col., 2000; Voets 2000; Sorensen 2004). Estas conclusiones se vieron reforzadas por experimentos en los cuales la aplicación de pulsos de despolarización capaces de agotar el IRP inmediatamente antes del *flash* generaron una reducción equivalente en el componente rápido asociado al RRP (Voets y col., 1999), demostrando que el IRP forma parte del RRP.

Las conclusiones delineadas arriba podrían verse cuestionadas por el hallazgo de un *pool* altamente sensible al  $\text{Ca}^{2+}$  (que se libera por *flashes* de menor intensidad) llamado HCSP (*Highly  $\text{Ca}^{2+}$ -sensitive pool*) (Yang y col., 2002). El HCSP es similar en tamaño al IRP, y su liberación es dos órdenes de magnitud más rápida que la del RRP. Sin embargo, esta hipótesis fue rechazada por los mismos autores, pues demostraron que el agotamiento de HCSP no afectó a la exocitosis de IRP (Yang y col., 2002).

Preparación	IRP [fF]	IRP/RRP (%)	Referencias
Cromafines - rata- cultivo	33,9	10%	Horrigan y Bookman, 1994
Cromafines -ratón - rebanadas	42	-----	Moser y Neher, 1997
Cromafines-ratón - rebanadas	46	25%	Voets y col., 1999
Cromafines - vacas - cultivo	~ 20	20%	Yang y col., 2002
Cromafines – vacas - cultivo	16	11%	Marengo, 2005
Cromafines - ratón-rebanadas	~ 65	46%	Chan y col., 2006
Cromafines – ratón - cultivo	26	16%	Álvarez y col., 2008
Células $\beta$ - ratón - rebanadas	100	50%	Barg y col., 2002
Células $\beta$ – ratón - rebanadas	20	10%	Wan y col., 2004
Células $\beta$ – ratón - rebanadas	16	8%	Qian y col., 2006
Células $\beta$ - ratón - rebanadas	8	7%	Merrinsand y Stuenkel, 2008

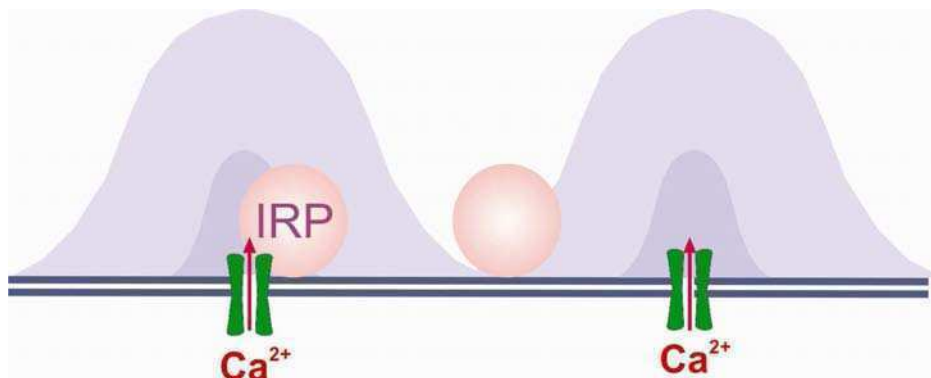
**Tabla 1.2** - Estimación del IRP en distintos tipos celulares y preparaciones. Tabla modificada de Álvarez y Marengo, 2010.

El IRP fue observado en otras preparaciones de células neurosecretoras como las células  $\beta$  del páncreas. Estas células se encuentran en los islotes de Langerhans, y sintetizan y secretan insulina a la sangre (Barg, 2003) (Tabla 1.2). El tamaño estimado del IRP en células  $\beta$ -pancreáticas es variable debido a diferencias en el estímulo seleccionado para medir este *pool* por diferentes autores (Barg y col., 2001; Ge y col., 2006). Sin embargo las mediciones más recientes indican que el IRP estaría formado por entre 4 y 10 vesículas, considerando 2 fF por vesícula. Este valor corresponde al ~10% del RRP total (Wan y col., 2004; Ge y col., 2006; Merrins y Stuenkel, 2008). Valores similares para el IRP fueron obtenidos en las células INS-1 de la rata (Yang y Gillis, 2004). El IRP también fue descrito en las terminales nerviosas aisladas de neurohipófisis de rata, consistiendo de aproximadamente 19 vesículas liberadas con una constante de tiempo de 40 msec (Giovannucci y Stuenkel, 1997).

El IRP de las células cromafines varía con el tipo de preparación biológica utilizada. Se demostró una menor eficiencia en el acoplamiento entre la activación y la secreción en las células cromafines en cultivo en comparación con las obtenidas en rebanadas de tejido (o *slices*). Los resultados en *slices* presentaron una exocitosis más prominente en respuesta a despolarizaciones cortas que las células en cultivo (Moser y Neher 1997). Además, el grado de co-localización entre los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  y las vesículas resultó ser mayor en *slices* (López y col., 2007). Finalmente, mientras las células cromafines aisladas de rata y bovinas revelaron una tasa de exocitosis para el IRP de aproximadamente  $20 \text{ seg}^{-1}$  (Horrigan y Bookman, 1994; Marengo, 2005), Voets y colaboradores (1999) estimaron un valor de  $150 \text{ seg}^{-1}$  en rebanadas de glándulas suprarrenales de ratón.

Según lo explicado más arriba, la hipótesis aceptada hoy en día postula que la exocitosis rápida y altamente acoplada al estímulo que presenta IRP se debe a una proximidad espacial entre las vesículas y los CCDV. Esta hipótesis está necesariamente asociada al desarrollo de gradientes localizados de  $\text{Ca}^{2+}$  alrededor de los canales durante despolarizaciones de corta duración (Llinas y col., 1992; Neher, 1998). Esta hipótesis está de acuerdo con que la tasa de aumento de capacitancia durante un pulso despolarizante de 100 msec sea mucho mayor que la que se observa cuando se induce un aumento promedio del  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico similar, pero provocado por diálisis de este catión desde la pipeta de *patch* o por la liberación del mismo desde compartimentos intracelulares (Augustine y Neher, 1992). Además, el agregado de un *buffer* rápido, BAPTA (1,2-bis (o-aminophenoxy) ethane-*N,N,N,N*-tetraacetic acid) a una concentración de 1 mM reduce fuertemente la exocitosis rápida en comparación con concentraciones equimolares de un *buffer* lento como EGTA (Moser y Neher, 1997a).

En resumen, una despolarización de corta duración activa CCDV en la membrana plasmática y en consecuencia produce una entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  que genera gradientes locales que rodean estos canales (Neher, 1998). Esta señal localizada de  $\text{Ca}^{2+}$  produce la fusión del pequeño grupo de vesículas que forman el IRP. Por otra parte, un estímulo prolongado (o más intenso) genera una señal más extensa de  $\text{Ca}^{2+}$  que también libera a las vesículas distantes del RRP (Figura 1.11).



**Figura 1.11** - Representación de las vesículas del IRP. Las vesículas del IRP estarían ubicadas en la proximidad de los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  (esfera a la izquierda), y por lo tanto estarían expuestas a una concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  alta (violeta oscuro) generando su liberación con despolarizaciones de corta duración. Las vesículas ubicadas a distancias mayores del canal de  $\text{Ca}^{2+}$  (esfera a la derecha) necesitan despolarizaciones más prolongadas que generen una mayor entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  (violeta claro) para poder ser liberadas. Figura inspirada en figura 6 de Rettig y col. (1997).

La pregunta que surge es ¿Cómo un número discreto de vesículas del RRP puede ubicarse cerca de los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  dando lugar al IRP? La posibilidad que las vesículas del RRP y los canales se distribuyan aleatoriamente en la membrana, y por lo tanto una porción de vesículas se ubique cercana a los canales fue considerada por Chow y col. (1994) y por Klingauf y Neher (1997). Alternativamente, podemos asumir que exista una distribución en las células cromafines en la cual las vesículas del IRP se encuentren acopladas espacialmente a los canales de  $\text{Ca}^{2+}$ , mientras que el resto de las vesículas del RRP se encuentren alejadas de ellos. El primer esquema es obviamente más simple que el segundo, pues no asume ninguna interacción específica. Sin embargo, Segura y col. (2000), usando las simulaciones probabilísticas tipo Monte Carlo, demostraron que una distribución al azar de vesículas y de canales no explica la respuesta bifásica que se observa en respuesta a un tren de despolarizaciones (Horrigan y Bookman 1994; Marengo, 2005). Este comportamiento bifásico, en donde se observa una fase de liberación rápida fundamentalmente sincrónica a los estímulos y luego una respuesta menos acoplada desfasada en el tiempo, puede ser modelado si se asume una distribución no uniforme de vesículas y canales, donde un grupo de vesículas son obligadas ubicarse a una distancia media de 25 nm de los canales, mientras que el resto del RRP son ubicadas a mayor distancia (Segura y col., 2000). Este resultado sugiere la existencia de una suerte de

interacción entre las vesículas del IRP y los canales de  $\text{Ca}^{2+}$ . Debemos además preguntarnos si esta interacción ocurre para un subtipo particular de canal, o no distingue entre distintos subtipos. Estas preguntas son enfocadas en la sección siguiente y en el capítulo 2.

## ***1.6 Acople entre los canales de calcio y las vesículas secretorias***

Todos los subtipos de CCDV mencionados en la sección 1.2.1.1 pueden contribuir a la liberación de productos de secreción en células cromafines si se aplica un estímulo adecuado. Se observó que frente a despolarizaciones largas los distintos subtipos participan en la secreción proporcionalmente a su contribución a la corriente total (Kim y col., 1995; Engisch y Nowycky, 1996; Lukyanetz y Neher, 1999; Aldea y col., 2002). Por lo tanto se concluyó que la secreción en ese caso está determinada por la acumulación de  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico sin importar el subtipo de canal de  $\text{Ca}^{2+}$  activado. Este tipo de estimulación relativamente fuerte, no sólo libera las vesículas del IRP sino que también provoca la liberación de las demás vesículas del RRP (Horrigan y Bookman 1994; Voets y col., 1999; Álvarez y col., 2008).

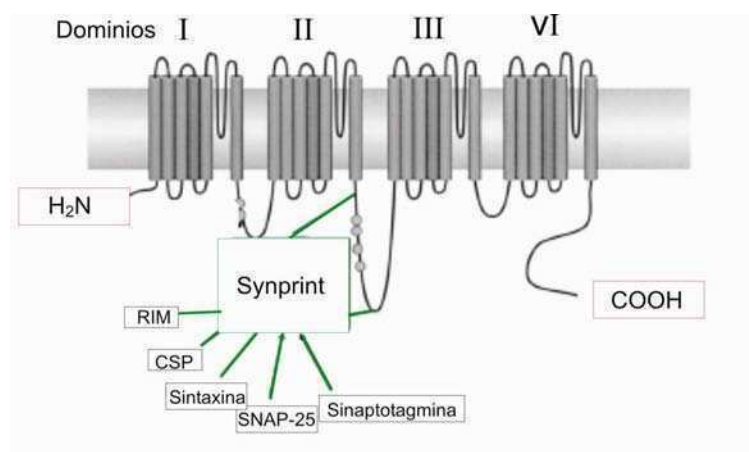
Existen algunas evidencias de que el subtipo de canal R está altamente acoplado a la exocitosis en *slíces* de médula adrenal en ratón (Albillos y col., 2000). Sin embargo existen mayor cantidad de evidencias que sugieren que sería el canal P/Q el que está mayormente acoplado con la exocitosis. Por ejemplo, Lara y col. (1998) mostraron que el grado de inhibición que produce el bloqueante del canal P/Q  $\omega$ -agatoxin-IVA es marcadamente mayor a baja concentración (0,5 mM) que a altas (5 mM) concentraciones de  $\text{Ca}^{2+}$  externo (Lara y col., 1998). Otros autores encontraron en ratones KO para el canal P/Q, que si bien la corriente de  $\text{Ca}^{2+}$  en estas células era completamente compensada por una sobreexpresión de canales tipo L, la eficiencia con que estas corrientes inducían exocitosis era significativamente menor que en las células provenientes de ratones salvajes (Aldea y col., 2002). Por último, se observó en *slíces* de la médula adrenal que la exocitosis inducida por un PA era particularmente sensible a la aplicación de  $\omega$ -agatoxin IVA (Chan y col., 2005b).

¿Pero cómo podría explicarse desde un punto de vista molecular la interacción entre tipos particulares de canales y vesículas? En terminales nerviosas del sistema nervioso central, se demostró que la subunidad  $\alpha_{1A}$  de los canales de calcio tipo N y P/Q posee una

secuencia aminoacídica llamada *synaptic protein interaction site (synprint)*, o en castellano, sitio de interacción de proteínas sinápticas, que está ubicada en el *loop* intracelular entre los dominios II y III (Sheng y col., 1998) (Figura 1.12). Ha sido ampliamente comprobado que *synprint* es capaz de interactuar con proteínas de la maquinaria exocitótica tales como syntaxina, SNAP-25 y synaptotagmina (Rettig y col., 1996; Jarvis y Zamponi, 2005) y otras proteínas sinápticas como la proteína CSP (*cysteine string protein*) y RIM (Davies y Zamponi, 2008).

Tradicionalmente, se postula que la función de *synprint* es mantener un acople físico entre las vesículas y los canales de  $\text{Ca}^{2+}$ , de modo de aumentar la eficiencia del proceso de acople funcional estímulo-secreción en los terminales sinápticos. Por ejemplo, la inyección de *synprint* en el ganglio cervical simpático (SCGNs) redujo al 42% la transmisión sináptica (Mochida, 1996). Por otro lado, la inyección del péptido *synprint* en neuronas de *Xenopus* produjo una reducción del 25% en la transmisión sináptica (Rettig y col., 1997).

Adicionalmente, también se postularon otras posibles funciones para *synprint*. Existen datos que indican que la asociación entre el *synprint* y las proteínas de la maquinaria exocitótica también regularía la actividad de los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  (Zhong y col., 1999; Zamponi, 2003; Jarvis y Zamponi, 2005). Finalmente el sitio de interacción, *synprint* también estaría implicado en otros procesos, tales como la localización de los canales de calcio de tipo P/Q en la membrana (Mochida y col., 2003; Jarvis y Zamponi, 2007) y la endocitosis (Watanabe y col., 2010).



**Figura 1.12** - Ubicación del sitio de interacción de proteínas sinápticas (*synprint*). Este sitio se ubica entre en el *loop* entre los dominios II – III. Con este sitio interactúan proteínas tales como: CSP, syntaxin 1, synaptotagmin 1, y SNAP-25. Figura modificada de Zamponi (2003).

Respecto a nuestro modelo experimental, existen algunos resultados previos que sugieren que el *synprint* podría tener importancia en el acople estímulo-secreción en células cromafines. La presencia de diferentes variantes de *splicing* del sitio *synprint* en canales de calcio de tipo P/Q fue identificada en células cromafines bovinas (Rajapaksha y col., 2008). Además se demostró la co-immunoprecipitación de la subunidad  $\alpha_{1A}$  con el complejo SNARE usando anticuerpos monoclonales contra SNAP-25 (Andrés-Mateos y col., 2005). Finalmente se observó que la subunidad  $\alpha_{1A}$  del canal P/Q y SNAP-25 co-localizan en la membrana intacta de las células cromafines (López y col., 2003; Andres-Mateos y col., 2005). A partir de estos resultados podemos plantear como hipótesis que el *synprint* podría mediar el acople entre las vesículas del IRP y los canales P/Q, determinando así la alta eficiencia de liberación de este grupo de vesículas.

## ***1.7 Endocitosis***

La endocitosis es un proceso por el cual la membrana plasmática es invaginada, y mediante la fisión de dichas invaginaciones, conduce a la consecuente formación de corpúsculos membranosos intracelulares (vesículas o alternativamente cisternas o vacuolas). Por medio de este proceso, la superficie de membrana agregada por la fusión de las vesículas durante la exocitosis es recuperada, devolviendo a las fracciones de membrana plasmática e intracelular a sus niveles originales. La internalización de la membrana contribuye a recuperar los niveles estacionarios de los *pools* de vesículas deprimidos por la exocitosis y también a restaurar la distribución de componentes proteicos de las fracciones de membrana plasmática e intracelular. De acuerdo a un criterio cinético, la endocitosis puede clasificarse en lenta y rápida.

### ***1.7.1 Endocitosis lenta***

La endocitosis lenta es un proceso de internalización de membrana que se desarrolla en un tiempo de aproximadamente ~15-30 minutos (Artalejo y col., 2002). Según Artalejo y colaboradores (Artalejo y col., 2002), este proceso correspondería a la endocitosis clásica dependiente de clatrina y sería dependiente de dinamina II (Chan y Smith, 2003; Koval y col., 2001). En la endocitosis dependiente de clatrina luego de que las vesículas colapsan



completamente con la membrana plasmática por exocitosis, ésta es recuperada en otra región de la membrana por invaginación de vesículas recubiertas de clatrina y otras proteínas accesorias (Figura 1.3) (Smith y col., 2008). La endocitosis mediada por clatrina no tiene forma de recuperar el núcleo proteico electrodensito de las vesículas secretorias, formado por cromogranina y otras proteínas. Por lo tanto este mecanismo endocitótico implica una recuperación de las vesículas secretorias muy lenta, ya que dicho proceso debe necesariamente involucrar al sistema de Golgi (Maxfield y McGraw, 2004). Este mecanismo es en general *compensatorio*, es decir que internaliza una cantidad de membrana equivalente a la previamente exocitada (Artalejo y col., 2002).

### ***1.7.2 Endocitosis rápida***

La endocitosis rápida (Artalejo y col., 1995; Burgoyne, 1995, Nucifora y Fox, 1999; Artalejo y col., 2002) se caracteriza por generar una reducción veloz del registro de capacitancia de membrana luego de una exocitosis. Este tipo de endocitosis se completa en aproximadamente 20 seg y no es dependiente de clatrina, pero sí es dependiente de GTP y dinamina I. Además, hay datos recientes que sugieren que es activada preferentemente por una entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  desde los canales de tipo L (Rosa y col., 2007).

A partir los resultados, algunos autores proponen la existencia de dos modos de internalización rápida de membrana aparentemente independientes (Smith y Neher, 1997; Engisch y Nowycky, 1998). El primero, que podemos denominar endocitosis rápida compensatoria, recupera una cantidad de membrana aproximadamente equivalente en área a la fusionada por la exocitosis asociada. Este proceso de internalización decae monoexponencialmente con una constante temporal que depende de la  $[\text{Ca}^{2+}]$  citosólica, que va desde unos 20 seg aproximadamente cuando el estímulo es débil, hasta unos ~ 5 seg si la estimulación es fuerte (Smith y Neher, 1997; Engisch y Nowycky, 1998). El segundo tipo, denominado *endocitosis en exceso*, recupera una cantidad de membrana mayor a la adicionada por exocitosis (Neher y Zucker, 1993; Thomas y col., 1994; Artalejo y col., 1995) y ocurre de una manera “todo o nada” luego de una estimulación fuerte (entrada de  $\text{Ca}^{2+} > 70 \text{ pC}$ ). En este último modo de endocitosis rápida no existe una clara relación entre su amplitud y la cantidad de membrana que se adiciona producto de la exocitosis precedente. La internalización de la membrana producida durante la endocitosis en exceso posee un componente inicial mucho más rápido que el observado para la endocitosis

compensatoria, y un segundo componente que es cinéticamente similar a la compensatoria ( $t_1 = 600$  mseg;  $t_2 = 6$  seg). En la tabla 1.3 se resumen las características cinéticas de las distintas endocitosis.

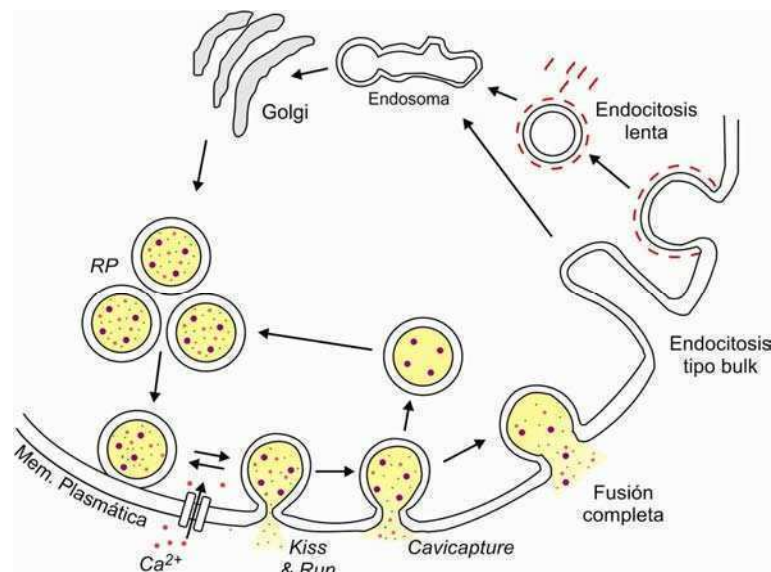
Se ha descrito también un proceso de endocitosis rápida compensatoria con tiempos característicos menores al segundo que ocurren luego de la aplicación de estímulos que simulan PA (Chan y Smith, 2001, Chan y Smith, 2003). Este tipo de endocitosis está presente a frecuencias bajas de PA y se inactiva a frecuencias altas (Chan y Smith, 2001).

Tipo de Endocitosis	Tiempos característicos	Técnica/referencia
<i>Endocitosis lenta</i>	$t_{1/2} \sim 15-30$ min	Inmunofluorescencia /Phillips 1983
	10 min.	<i>Whole cell</i> /Artalejo 2002
<i>Endocitosis rápida</i>		
<b>En exceso</b>	$\tau_1 \approx 0,6$ seg y $\tau_2 \approx 6$ seg	<i>Patch perforado</i> /Engisch y Nowycky (1998)
<b>Compensatoria</b>	$\tau \approx 5-20$ seg	<i>Patch perforado</i> /Engisch y Nowycky (1998)
<b>Compensatoria después de AP</b>	$\tau \approx 560$ mseg	<i>Patch perforado-patch Clamp</i> /Chan y Smith (2001)

**Tabla 1.3 - Características cinéticas de la endocitosis lenta (clásica) y rápida en células cromafines**  
Modificada de Cárdenas y Marengo (2010).

Se puede ver que el panorama es bastante complejo, ya que existirían diversos procesos de endocitosis rápida. De cualquier manera se han presentado evidencias de que al menos parte de la endocitosis rápida podría explicarse a través de un mecanismo de internalización de membrana luego de una fusión transitoria, al estilo *kiss and run* (Artalejo y col., 1998;

Elhamdani y col., 2006) (Figura 1.3). Un mecanismo de este tipo permitiría un llenado rápido del *pool* de vesículas liberables luego de la exocitosis (Artalejo y col., 1998). El *kiss and run* fue propuesto originalmente por Ceccarelli (1973) utilizando microscopía electrónica en placa neuromuscular. Posteriormente fue estudiado en células cromafines por otros autores (Albillos y col., 1997; Alés y col., 1999) mediante una elegante combinación de mediciones de amperometría y capacitancia en *patch* con una resolución de vesículas únicas.



**Figura 1.13** - Tipos de endocitosis y ciclado vesicular. Las vesículas del pool de reserva (RP) son traslocadas a la membrana. Una vez activadas, la entrada de calcio dispara la fusión, que puede ser transitoria, de tipo *kiss and run* o *cavicapture*, o una fusión completa. En este último caso la membrana deberá recuperarse a por la vía clásica dependiente de clatrina (Endocitosis lenta) o en ciertos casos particulares a través de una endocitosis de tipo “bulk”. Las vesículas endocitadas por la vía clásica pierden rápidamente sus cubiertas de clatrina (línea punteada roja) y son movilizadas hacia endosomas y luego al Golgi.

### 1.8 Ciclado vesicular, recuperación y regulación del IRP

El ciclado vesicular puede entenderse como un conjunto de eventos celulares que involucran la generación, movilización, maduración, fusión y recuperación de vesículas dentro de la célula. Estos eventos tienen diversas implicancias en la fisiología celular como el recambio constitutivo de membrana plasmática (Henkel y col., 2000), la incorporación de

sustancias desde el exterior asociadas por ejemplo, a transferrina o lipoproteínas (Galli y Haucke, 2004), la incorporación de proteínas señalizadoras extracelulares como factores de crecimiento (Bonifacino y Traub, 2003) o la excreción y/o secreción de compuestos producidos dentro de la célula (Verdugo, 1990). Particularmente en células neurosecretoras y neuronas, los procesos de reciclado vesicular son importantes para el mantenimiento de los *pools* de vesículas secretorias. Estos *pools* son deprimidos por la exocitosis y por lo tanto, la endocitosis, el transporte y la maduración de vesículas aseguran la provisión de nuevas vesículas competentes para la liberación, y de esta forma garantizan la confiabilidad de la transmisión de información de las células secretoras a las células blanco, especialmente ante estimulaciones intensas o prolongadas.

En el capítulo anterior se mencionaron las diferentes vías endocitóticas que existen en las células cromafines. Dado que las vesículas recicladas se originan directa o indirectamente de fracciones de la membrana internalizada, la endocitosis constituiría el primer paso del reciclado vesicular.

Una vez que las vesículas secretorias son generadas de novo desde el Golgi, deben seguir una serie de pasos madurativos. Estos pasos madurativos han sido estudiados utilizando la técnica de *flash photolysis* de  $\text{Ca}^{2+}$  enjaulado combinada con mediciones de capacitancia en células cromafines (Heinemann y col., 1993; Smith y col., 1998; Ashery y col., 2000) tal como se explicó en la sección 1.4. Este esquema de pasos secuenciales de maduración culmina en el RRP, compuesto por vesículas que se liberan rápidamente frente a una señal elevada de  $\text{Ca}^{2+}$  en todo el citosol, como la inducida por *flash photolysis*. Recordemos que el llenado de RRP se produce a expensas de las vesículas de SRP, con el cual se halla conectado en serie (Voets y col., 1999). Cuando se estudió el RRP a diferentes concentraciones de  $\text{Ca}^{2+}$  basal, se determinó que la transferencia de vesículas desde SRP a RRP en condiciones estacionarias puede ser explicada asumiendo una regulación por  $\text{Ca}^{2+}$  de la forma Michaelis-Menten (Smith y col., 1998; Voets, 2000). El relleno del IRP después de su depresión fue estudiado por Moser y Neher (1997) usando dos pulsos de 20 mseg separados por distintos intervalos de tiempo. Los resultados muestran que la recuperación del IRP puede ser ajustada con una simple exponencial con una constante de tiempo de ~10 seg. Este valor es parecido al obtenido para la recuperación del RRP (3-15 seg) (Moser y Neher 1997; Voets y col., 1999; Dinkelacker y col., 2000).

La relación entre el RRP y el IRP no se encuentra definida en la bibliografía. Es posible pensar que la recuperación del IRP, por ser este *pool* supuestamente parte del RRP, dependería del SRP. Sin embargo, Chan y col., (2005) plantearon la posibilidad de que el llenado del IRP sea desde el RRP en forma secuencial, a partir de los resultados experimentales en los ratones KO de la NCAM que muestran un déficit en el tráfico desde el RRP al IRP porque el tamaño del IRP es significativamente menor, mientras que el RRP está aumentado.

Existen evidencias que indican que el tamaño del IRP puede ser regulado por diversos factores. Primero, existen datos experimentales que muestran que el tamaño puede ser regulado por el  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico basal (Marengo, 2005). Este resultado es consistente con la regulación por  $\text{Ca}^{2+}$  antes mencionada para el RRP. Además es interesante notar que Becherer y col. (2003), usando microscopía de campo evanescente mostró que la localización de la señal de  $\text{Ca}^{2+}$  induce la movilización de las vesículas hacia los sitios de entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  (Bechere y col., 2003), planteando la posibilidad de que la interacción física entre vesículas y canales es favorecida por el mismo  $\text{Ca}^{2+}$ . Segundo, Chan y col. (2005a) demostraron que el traspaso de vesículas del RRP al IRP es dependiente de la molécula de adhesión de células neuronales (NCAM). Los ratones deficientes de esta proteína muestran un déficit en el tráfico desde el RRP al IRP, consecuentemente el tamaño del IRP en los ratones KO de NCAM es significativamente menor, mientras que el RRP está aumentado. Otros autores encontraron que la activación de los receptores de histamina endógenos acoplados a proteína G aumentan el tamaño del IRP a través de un camino de señalización que involucra la fosfolipasa C y la Munc13 (Bauer y col., 2007). También, la activación de proteína quinasa C, aumentan el IRP y el RRP (Voets y col., 1999). Por último, Xu y col., (2005) reportaron que los glucocorticoides aumentan el tamaño del IRP en células cromafines de ratas sin modificar el tamaño del RRP. En conclusión, algunos datos experimentales muestran que el IRP puede ser regulado como *pool* independiente y otros en los que la regulación del IRP esta asociada al RRP.

La existencia de un mecanismo endocitótico rápido en las células cromafines (Barg y Machado, 2008) permite también plantear la hipótesis que IRP se pueda fusionar y por lo tanto recuperar directamente a través de un mecanismo del tipo *kiss and run*. Esta hipótesis es abonada por la presencia de una endocitosis sumamente rápida que se desarrolla inmediatamente después de la exocitosis inducida por PA a bajas frecuencias (Chan y Smith, 2001, Chan y Smith, 2003). Si bien las vesículas recaptadas por *kiss and run* no

poseerían la totalidad su contenido original, podrían ser rellenas con pequeños transmisores a través de transportadores de membrana, lo que les permitiría sufrir varias rondas de exocitosis, tal como fue reportado previamente (Von Grafenstein y Knight, 1992; Elhamdani y col., 2001; Fulop y col., 2005).

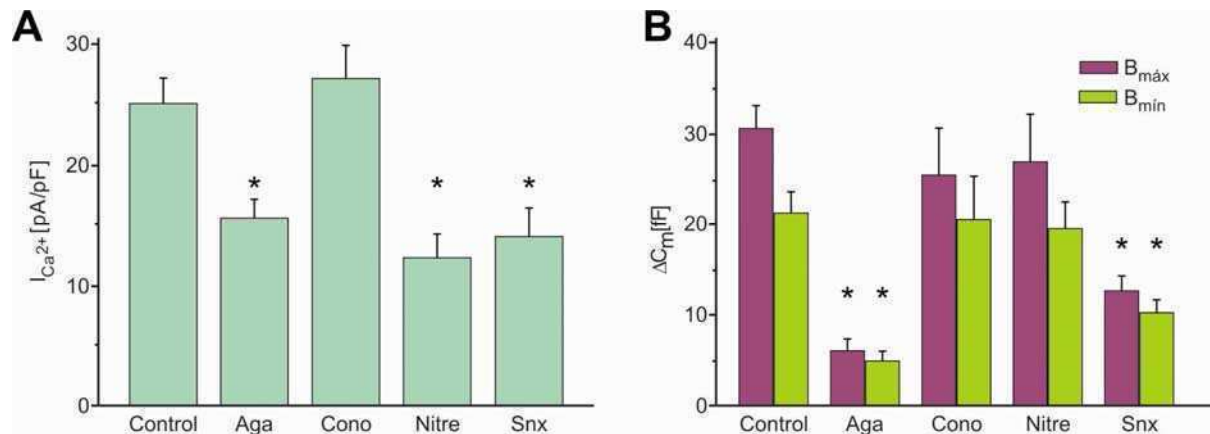
## **2 RESULTADOS PRELIMINARES A ESTA TESIS**

### **2.1 Tipos de canales de calcio asociados al IRP**

La supuesta colocación de las vesículas de IRP con los canales de  $\text{Ca}^{2+}$ , como se explicó en la introducción, no puede ser explicada por una distribución al azar de las vesículas y los canales (Segura y col., 2000). La hipótesis alternativa asume una interacción específica con dichos canales, y posiblemente con un tipo de canal de  $\text{Ca}^{2+}$  en particular. Si se demostrara que IRP está asociado a un subtipo de canal de  $\text{Ca}^{2+}$ , en primer lugar la hipótesis de la distribución al azar de ambas entidades quedaría descartada, y en segundo lugar abriría la puerta a la existencia de un mecanismo específico de interacción. Esta última posibilidad fue inicialmente abordada durante el seminario de licenciatura en física que realizó la autora de esta tesis. Si bien los experimentos y el análisis de los mismos fueron completados durante el primer año del período doctoral (Álvarez y col., 2008), decidimos ubicar todos esos resultados como un único bloque en este capítulo debido a la unidad temática que poseen los mismos. A continuación se presenta una síntesis de dichos resultados.

El acople funcional de los diferentes subtipos de CCDV con el IRP se estudió en primer lugar mediante la aplicación de bloqueantes específicos para dichos canales. El IRP se estimó a través de un protocolo de pulsos pareados (ver sección 4.2.1.7) que permite obtener un valor mínimo ( $B_{\min}$ ) y máximo ( $B_{\max}$ ) de su tamaño. Los bloqueantes para canales P/Q,  $\omega$ -agatoxina IVA (Aga); para canales L, Nitrendipina (Nitre); y para canales R, SNX - 482 (Snx), redujeron significativamente la densidad de las corrientes de  $\text{Ca}^{2+}$  inducidas por dicho protocolo en comparación con el control ( $p < 0,05$ ), lo que no se observó con el bloqueante del canal N,  $\omega$ -conotoxina (Cono) (Figura 2.1A). Estos resultados indican que sólo los canales L, P/Q y R, conducen corrientes de  $\text{Ca}^{2+}$  sensibles a voltaje en nuestras células bajo nuestras condiciones experimentales. Los resultados de medición de capacitancia mostraron en cambio, que la exocitosis no se correlacionaba con la modificación observada en las corrientes. Mientras que el bloqueo de los canales L no produjo cambios significativos en el IRP, aún cuando la corriente transportada por esos canales disminuyó a un 50% respecto del control, el bloqueo de los P/Q provocó una inhibición muy marcada (80%) de la liberación de este *pool* ( $p < 0,001$ ). La aplicación de Snx produjo una inhibición también significativa, pero menor a la provocada por Aga (Figura

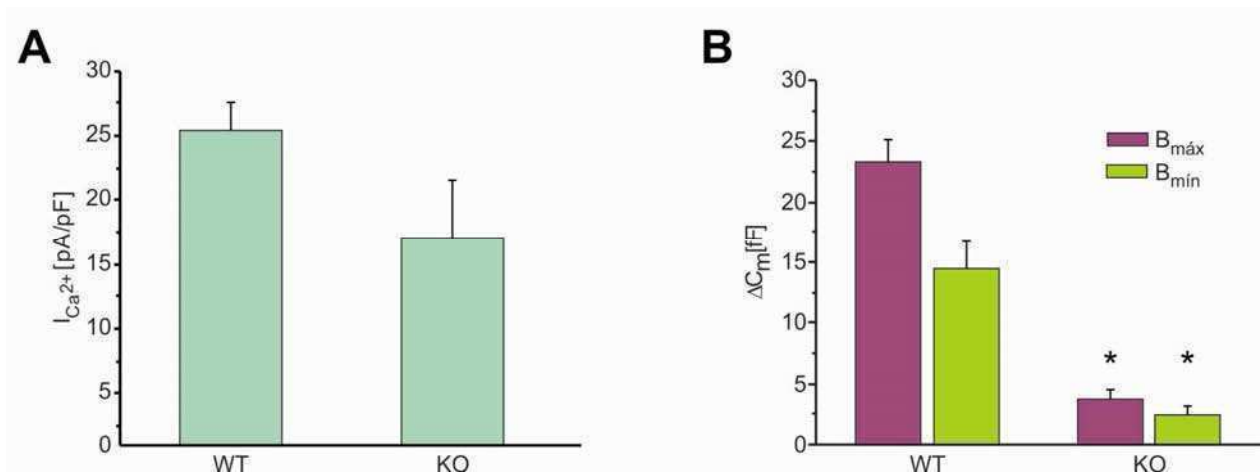
2.1B). Estos resultados muestran que la liberación de las vesículas que conforman el IRP están principalmente acopladas con la entrada de calcio por los canales P/Q y en menor proporción por canales R (Álvarez y col., 2008).



**Figura 2.1:** Contribución de los distintos tipos de canales a la liberación del IRP. En esta figura se muestran los valores medios de los experimentos realizados en presencia de las distintos bloqueantes de los canales de calcio (L, P/Q y N) junto con los experimentos controles. En (A) las barras representan las densidades de corriente de  $Ca^{2+}$  en condiciones control ( $n=46$ ) y con los bloqueantes específicos de los canales: 10  $\mu M$  de Nitrendipina (Nitre), 2  $\mu M$   $\omega$ -conotoxina (Cono), 1  $\mu M$  de SNX-486 (Snx) y 200 nM de  $\omega$ -agatoxina-IVA (Aga) se utilizaron para el bloqueo de los canales L, N, R y P/Q respectivamente. El bloqueo de los canales L ( $n=15$ ), R ( $n=25$ ) y P/Q ( $n=15$ ) producen una disminución significativa de la densidad de corriente ( $p<0.05$ ), mientras que el bloqueante del canal N ( $n=15$ ) no modificó las corrientes. En (B) se muestra el efecto de los bloqueantes sobre el IRP estimado por el protocolo de doble pulso. Mientras que en presencia de Nitre no se observaron cambios, y con Snx el IRP se inhibió moderadamente, en presencia de Aga el tamaño del IRP disminuyó muy marcadamente respecto del control ( $p<0.002$ ). Modificado de Álvarez y col., (2008).



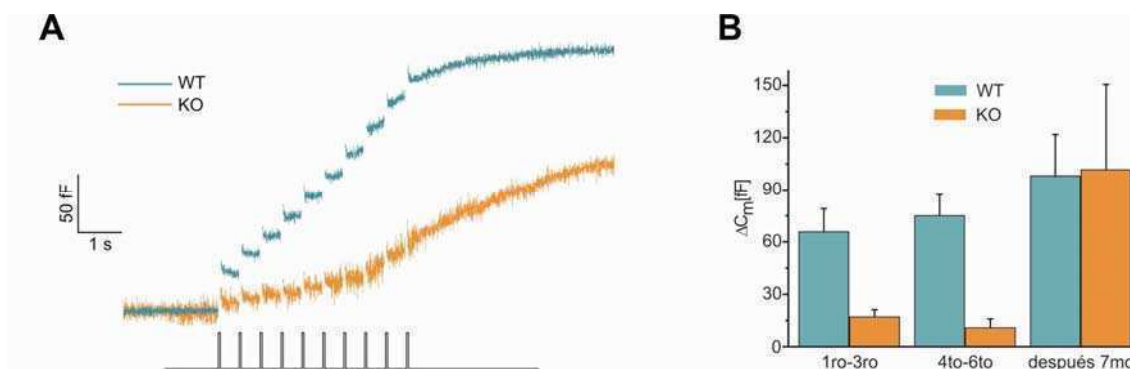
Para continuar analizando la participación de los canales P/Q en la exocitosis del IRP utilizamos animales KO de la subunidad  $\alpha_{1A}$  (subunidad funcional del canal P/Q). En el diagrama de barras de la figura 2.2 se comparan los valores promedios de las densidades de corriente y los valores de  $B_{\text{máx}}$  y  $B_{\text{mín}}$  en KO y WT. Las densidades de corriente en KO son levemente inferiores a las medidas en WT, sin embargo, esta diferencia no resultó significativa. Los resultados en el IRP evidencian que la liberación de este *pool* sufre una notable disminución ante la ausencia del canal P/Q.



**Figura 2.2:** En esta figura se muestran los promedios de los experimentos realizados con ratones KO (n=15) y WT (n=46) (A) Las barras representan la densidad de corriente promedio. No se detectaron cambios significativos en las densidades de corrientes entre WT y KO. (B) Las barras representan las cotas superiores e inferiores asociadas al IRP y expresadas ambas en unidades de capacitancia. La exocitosis del IRP resultó marcadamente inferior en los KO ( $p < 0.001$ ). Modificado de Álvarez y col., (2008).

Clásicamente se observó que las despolarizaciones en forma de trenes permiten distinguir cinéticamente al menos dos fases en la exocitosis de células cromafines, una sincrónica al estímulo y por lo tanto altamente acoplada a la corriente de  $Ca^{2+}$  que se manifiesta al comienzo del tren, y otra asincrónica y pobremente acoplada que aparece posteriormente. Por lo tanto, pensamos que la comparación de las respuestas exocitóticas a la aplicación de trenes de pulsos despolarizantes en ratones KO y WT nos permitiría poner a prueba nuevamente la hipótesis sobre el acoplamiento de los canales P/Q con el IRP. En base a nuestra hipótesis sería esperable que el componente sincrónico inicial se encuentre fundamentalmente asociado a IRP (Marengo, 2005; Voets y col., 1999). Debido a esto esperaríamos que este componente desaparezca o al menos disminuya significativamente

en el KO, mientras que la fase asincrónica posterior debería permanecer. En la figura 2.3 se muestran superpuestos los promedios de las mediciones de los cambios en la capacitancia celular inducidos por trenes de 10 estímulos (ver leyenda de la figura) en células de ratones WT y KO. La comparación entre los trazados permite observar una disminución de la fase sincrónica con el estímulo en los KO, mientras que la fase sostenida se mantiene, consecuentemente, la respuesta total no alcanza los valores obtenidos en WT.



**Figura 2.3:** Registro de capacitancia generado en respuesta a un tren de 10 despolarizaciones de 50 msec aplicadas a una frecuencia de 2 Hz. (A) Promedio de los trazados resultantes de los experimentos realizados en células de ratón WT (n=15, trazado celeste) y en ratones KO del canal P/Q (n=14, trazado naranja). La comparación nos permite observar que en los ratones KO la fase inicial sincrónica se ve reducida en relación con los WT, pero la fase más lenta permanece. (B) El diagrama de barras resume la exocitosis provocada por el tren, separando la respuesta en 3 porciones. Una primera parte hasta el tercer pulso; una segunda desde el cuarto al sexto y por último, del séptimo hasta 4 seg después determinado del tren. En las dos primeras porciones la inhibición de la exocitosis es significativa ( $p < 0.001$ ) mientras que en la última no hay diferencias significativas. Modificado de Álvarez y col. (2008).

Con el fin de analizar las respuestas exocitóticas sincrónicas y asincrónicas más detalladamente, se separó la respuesta al tren en tres porciones. Una primera porción, desde el primero hasta el tercer pulso, que corresponde a la liberación más acoplada al estímulo, en la cual no hay una importante acumulación de  $\text{Ca}^{2+}$  residual (Marengo y Monck, 2003). Una segunda porción desde el cuarto al sexto pulso, que sigue siendo parcialmente sincrónica aunque se espera que exista algo de acumulación de  $\text{Ca}^{2+}$  residual (Marengo y Monck, 2003). Y finalmente una tercera porción, desde el séptimo pulso hasta 4 seg después de terminado el tren, genera una exocitosis asincrónica con el estímulo debido a

una acumulación significativa de  $\text{Ca}^{2+}$  residual (Marengo y Monck, 2003). En la figura 2.3 B se presenta el resultado de este análisis para ratones *WT* y *KO*. En primer lugar, se observa que en las dos primeras porciones los resultados de los ratones *KO* muestran una inhibición significativa en comparación con el *WT*. Por otro lado se observa que en la tercera porción, las respuestas son similares entre *KO* y *WT*. Estos resultados confirman la idea del alto acoplamiento existente entre los canales P/Q y las vesículas del IRP, y muestran que en la exocitosis asincrónica otros subtipos de canales también contribuyen a la exocitosis.

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo general**

Los estudios realizados en esta tesis están dirigidos a entender las propiedades del acople entre el estímulo y la liberación del *pool* de vesículas inmediatamente liberable (IRP), como así también a contribuir a establecer los límites funcionales de este *pool*, en células cromafines de ratón.

##### **3.1.1 Objetivos particulares**

(1) El presente trabajo tiene como primer objetivo profundizar la caracterización del acople funcional que se establece entre los canales de calcio dependientes de voltaje y el IRP. Para poner a prueba la hipótesis que propone una proximidad espacial entre los canales de calcio y las vesículas del IRP, evaluamos la sensibilidad de este *pool* respecto a *buffers* de calcio lentos y rápidos. En segundo lugar, re-analizamos el papel preponderante que tendrían los canales de calcio tipo P/Q en la asociación vesícula canal.

(2) El segundo objetivo de esta tesis ha sido investigar el mecanismo por el cual se establece la asociación entre las vesículas de IRP y los canales de  $\text{Ca}^{2+}$ . Como ya se mencionó, nuestros resultados previos mostraron fuertes evidencias de la existencia de un acople funcional específico de los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  P/Q con la exocitosis del IRP. A consecuencia de estos resultados, proponemos como hipótesis que las vesículas del IRP se asocian espacialmente con canales P/Q por medio de una interacción molecular específica. Esta hipótesis tiene un asidero estructural en la conocida existencia de una región (*synprint*) presente en el canal P/Q, que es capaz de unir proteínas vesiculares y de la maquinaria exocitótica para aumentar la eficiencia de liberación en las terminales nerviosas (Sheng y col., 1999). Esta posibilidad fue estudiada transfectando nuestras células cromafines con un plásmido que contiene la secuencia del péptido *synprint*. Se espera que, si la hipótesis es correcta, el agregado del *synprint* libre exógeno compita con la secuencia endógena en el canal, generando un desacople de la interacción vesícula-canal y por lo tanto una inhibición en la exocitosis del IRP.

(3) El tercer objetivo de esta tesis ha sido evaluar los límites operativos del IRP en la fisiología de la célula cromafín. La función principal de las células cromafines es liberar catecolaminas, fundamentalmente adrenalina, al torrente sanguíneo en respuesta a trenes de potenciales de acción. Es completamente esperable que debido a la corta duración de los potenciales de acción de las células cromafines (5 mseg), la exocitosis resultante se produzca a expensas del IRP. En una situación de reposo, la frecuencia de disparo de estas células es de aproximadamente 0,5 Hz, mientras que en condiciones de estrés, esta puede aumentar hasta 10-15 Hz, generando la liberación masiva de catecolaminas y péptidos activos (Iijima y col., 1992; Chan y Smith, 2001). La capacidad de respuesta del IRP frente a las diferentes frecuencias de estímulo dependerá en gran medida de la velocidad de recuperación de este *pool* luego de haber sido deprimido. La pregunta central que nos planteamos es: ¿A qué rango de frecuencias de potenciales de acción es capaz de responder el IRP de manera sostenida? Para contestar esta pregunta analizamos: (i) La cinética con el que se recupera el IRP y su posible regulación por calcio; (ii) la exocitosis, la endocitosis y la recuperación asociada a la aplicación de potenciales de acción individuales y (iii) finalmente las respuestas exocitótica-endocitótica frente a trenes de potenciales de acción. La información obtenida en esta sección es utilizada para formular una hipótesis respecto a los mecanismos de recuperación involucrados frente a una situación fisiológica.

Basándonos en los resultados experimentales desarrollamos un modelo computacional de la exocitosis en las células cromafines. Nos propusimos simular los distintos procesos involucrados, es decir la entrada y difusión del calcio, la reacción entre calcio y buffers y la exocitosis dependiente de calcio. Este modelo fue utilizado como herramienta para analizar diferentes hipótesis a partir de los resultados experimentales asociados a los distintos objetivos planteados.

## **4 MATERIALES Y MÉTODOS**

### **4.1 Cultivo y transfección de células cromafines**

En el preparado de células cromafines en cultivo de ratón la principal dificultad se relaciona con la pequeña cantidad de tejido disponible en la médula adrenal. Por esta razón, es importante minimizar la pérdida de tejido durante el procedimiento de forma de incrementar el rendimiento de los cultivos y la eficiencia de la transfección.

#### **4.1.1 Soluciones de cultivo y transfección**

*Hanks (en mg/ml):* 0,4 KCl, 0,06 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 8 NaCl, 0,35 Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 0,09 Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, suplementada con 3 µl/ml de penicilina /estreptomicina y 1 mg/ml de glucosa.

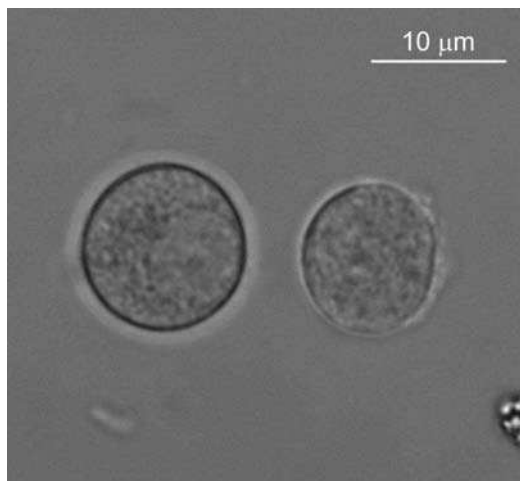
*Medio de cultivo DMEM suplementado:* medio Eagle modificado de Dulbecco (DMEM) baja glucosa suplementado con 5% de suero fetal bovino, 5 µl/ml de penicilina/estreptomicina, 1,3µl/ml de gentamicina, 1mg/ml de seroalbúmina bovina, 10 µM de citosina-1-β-D-arabinofuranósido.

*Medio de cultivo OPTIMEM:* Medio de cultivo reducido en suero modificado de medio Eagle, con HEPES y bicarbonato de sodio y suplementado con 2,4 g/l L-glutamina y factores de crecimiento.

#### **4.1.2 Procedimiento para el cultivo**

Para la preparación de cada cultivo primario de células cromafines se extrajeron las glándulas adrenales de dos ratones (129/sv X C57BL/6J) de edades entre 12 y 18 días. Los animales fueron anestesiados con una sobredosis de avertina (0,5ml) administrada en forma intra-abdominal. Una vez que se accedió a las cavidades peritoneal y torácica utilizando material quirúrgico adecuado, se realizó un corte en la vena cava inferior y se perfundió al animal lentamente desde el ventrículo izquierdo con 10 ml de solución de Hanks previamente oxigenada. Luego, se extrajeron las glándulas adrenales, ya limpias de sangre, y se las colocaron en una caja de petri estéril sobre una lupa para su disección. Primero se removió la grasa circundante y luego la corteza adrenal, para finalmente quedarnos con la médula adrenal en la que se encuentran las células cromafines. La disección es un paso

crítico en el resultado del cultivo, ya que si la remoción de la corteza no es total se observa una disminución en la proporción de células cromafines en relación a otros tipos celulares como fibroblastos. Una vez disecadas, las cuatro médulas fueron colocadas en un tubo de 1,5 ml. y digeridas en una solución de Hanks conteniendo 0,5-1 mg/ml de papaina durante 25 min. a 37°C.

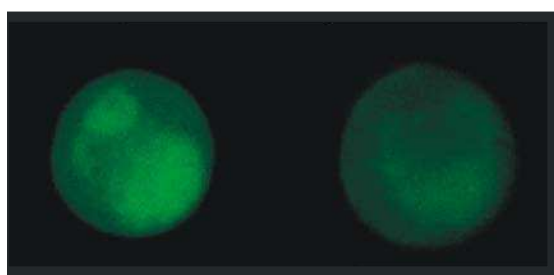


**Figura 4.1** - Imágenes de células cromafines en cultivo. Estas imágenes DIC fueron tomadas con un objetivo 40X. Las células cromafines se distinguen por ser de forma esférica en cultivo y por poseer una gran cantidad de vesículas en su citoplasma.

Los pasos siguientes del cultivo fueron realizados en un flujo laminar para mantener las condiciones de esterilidad. Luego de remover la enzima con tres lavados con 200 µl de medio de cultivo DMEM suplementado, las médulas fueron disgregadas, y se las llevó a un volumen final de 600 µl en DMEM. Esta solución fue filtrada secuencialmente a través de mallas con poros de 200 y 50 µm. Finalmente, las células fueron plaqueadas sobre cubreobjetos cortados en cuartos previamente polilisinados (aproximadamente 40 µl de suspensión celular por cubreobjeto) y colocados de a pares en cajas de Petri de 35 mm. Luego de incubar por 2 horas en estufa a 37 °C con una atmósfera de 95% O<sub>2</sub> - 5% CO<sub>2</sub>, se agregaron 2 ml. de medio de cultivo DMEM por cada caja de Petri, las cuales se mantuvieron en la estufa por las siguientes 24 hs. Estas células fueron utilizadas para las mediciones hasta 48 hs. después. En la figura 4.1 se observan fotos tomadas de un cultivo típico de células cromafines de ratón realizado en nuestro laboratorio.

### 4.1.3 Procedimiento para la transfección

Para la transfección del plásmido *synprint*-pIRES2-EGFP o del pIRES2-EGFP (Clontech Laboratories, Takara Bio, EEUU) se utilizó lipofectamina 2000. El procedimiento de transfección se comenzó tres horas después de terminado el cultivo. Para realizar la transfección es necesaria la formación del complejo lipofectamina – plásmido, que permite que el plásmido ingrese a la célula. Para generar este complejo se preparó una suspensión que consta de 20  $\mu$ l de lipofectamina y 480  $\mu$ l de OPTIMEM y se lo dejó incubando durante 7 minutos. Mientras tanto se preparó otra suspensión con 8  $\mu$ l de plásmido y 100  $\mu$ l de OPTIMEM. Cumplidos los 7 minutos se mezclaron ambas. Esta nueva suspensión necesita aproximadamente 20 minutos de incubación para que sea posible la formación del complejo. Pasado este tiempo, se procedió a reemplazar el medio DMEM que baña las células por 1.5 ml de medio OPTIMEM en cada placa, teniendo cuidado de no generar burbujas. Luego, se agregó el complejo lipofectamina – plásmido gota a gota sobre cada vidrio (aproximadamente 40  $\mu$ l por vidrio) y se volvió a colocar en la estufa a 37°C (CO<sub>2</sub> 5%) durante una hora y cuarto, que es el momento en el cual se produce la transfección. Al terminar este tiempo se retiró el medio con el complejo y se repuso el medio DMEM, finalizando la transfección. Los tiempos de incubación para la formación del complejo y de la transfección fueron fijados de forma tal de maximizar el número de células transfectadas. En la figura 4.2 se muestran ejemplos representativos de células transfectadas con *synprint*-pIRES2-EGFP. Para los experimentos se seleccionaron células que presentan un grado de fluorescencia moderada o baja (ver figura 4.2-foto de la derecha) para tratar de excluir a las células en las que se haya expresado una cantidad excesiva de proteína.



**Figura 4.2-** Imágenes de células cromafines transfectadas con *synprint*-pIRES2-EGFP en cultivo. Imágenes tomadas con el microscopio confocal FLUOVIEW con un objetivo de 40X.



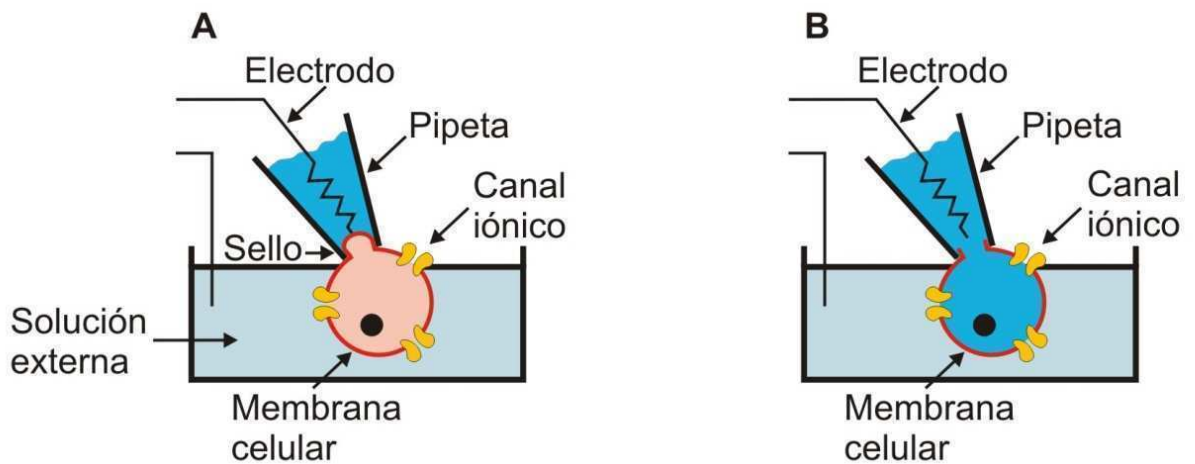
## 4.2 Técnica patch clamp

### 4.2.1 Generalidades

El método de *voltage clamp* nos permite controlar el potencial de membrana y medir las corrientes que pasan por los canales iónicos (Hodgkin y Huxley, 1952). La aplicación de esta técnica implica la introducción de al menos un microelectrodo que esté en contacto con el medio intracelular y un electrodo de referencia en el medio extracelular. Si bien se han desarrollado diferentes alternativas para introducir un electrodo en contacto con el citosol, la técnica desarrollada en los años ´70 por Neher y Sakmann (Neher y Sakmann ,1976) y conocida como *patch clamp* es hoy en día la técnica más elegida para trabajar con la mayoría de los tipos celulares. Si bien existen distintas configuraciones de esta técnica, el punto común a todas es la formación de un sello entre una pipeta de vidrio de alrededor de 1  $\mu\text{m}$  de diámetro en su punta, y la membrana celular. La resistencia del sello es de crítica importancia, ya que influye marcadamente en el ruido eléctrico presente en la medición. El microelectrodo queda conformado por el conjunto de la micropipeta que se llena con una solución electrolítica y un alambre de plata clorurado. Para formar el sello, el primer paso es apoyar la pipeta sobre la superficie de la célula, y luego aplicar pulsos de presión negativa hasta alcanzar una resistencia mayor a 1  $\text{g}\Omega$  a lo que se denomina gigasello. Para lograr un buen gigasello es necesario que las puntas de las pipetas estén bien limpias y pulidas. A la configuración obtenida una vez formado el gigasello entre la pipeta y la membrana se la denominada *cell attached* (Figura 4.3A). Esta configuración, permite medir la actividad de los pocos canales situados en el parche de la membrana que quedaron dentro de la punta de la pipeta con la célula intacta. Al retirar rápidamente la pipeta de la célula, llevándose el sello, la sección de membrana intracelular quedaría expuesta a la solución externa. Esta configuración permite evaluar la actividad de los canales y su regulación por factores que actúen del lado intracelular y se la denomina *inside-out patch*.

Una tercera configuración, la llamada *whole cell*, es la que se utiliza para medir a un nivel celular global tanto las corrientes de membrana, como los cambios de potencial (en modo *current clamp*), y los cambios de capacitancia. Los cambios de capacitancia están directamente relacionados a las actividades exocitóticas y endocitóticas de la célula. Para obtener esta configuración, que es la que se aplica en este trabajo de tesis, una vez obtenida la configuración *cell attached* se pone a la membrana al potencial de *holding* de -80

mV y se succiona hasta romper la sección de membrana dentro de la pipeta (Figura 4.3B). Cuando dicha sección de membrana se rompe, el electrodo forma un circuito continuo con el interior de la célula. Entonces, frente a la aplicación de un pulso cuadrado de voltaje se observa una respuesta transitoria capacitiva por el aporte de la capacitancia y la resistencia de la membrana celular al circuito (Figura 4.4A). En la configuración *whole cell* la solución incluida en la pipeta ingresa al interior de la célula reemplazando a la solución interna fisiológica. Debido a ello, esta solución se prepara intentando simular las condiciones intracelulares, pero introduciendo las modificaciones que sean convenientes a cada serie experimental. Por medio del microelectrodo se controla el potencial del lado interior de la membrana, mientras que el lado exterior estará expuesto al potencial del baño en el que se encuentra la célula, que se conecta a tierra.



**Figura 4.3-** Esquema de la formación del gigasello. (A) La pipeta se apoya sobre la superficie de la membrana y con presión negativa se forma el sello (configuración *cell attached*). (B) Una vez que se rompe la pequeña sección de la membrana contenida dentro de la punta de la pipeta se consigue llegar a la configuración *whole cell*.

Si se fija una diferencia de potencial de  $-80$  mV entre los medios extracelulares e intracelulares ( $V_{\text{intra}} - V_{\text{extra}}$ ), la membrana estará en condiciones similares al reposo, no habiendo flujo neto de iones. Pero si se imponen potenciales más positivos, que superen cierto valor umbral, se activarán canales dependientes del voltaje.

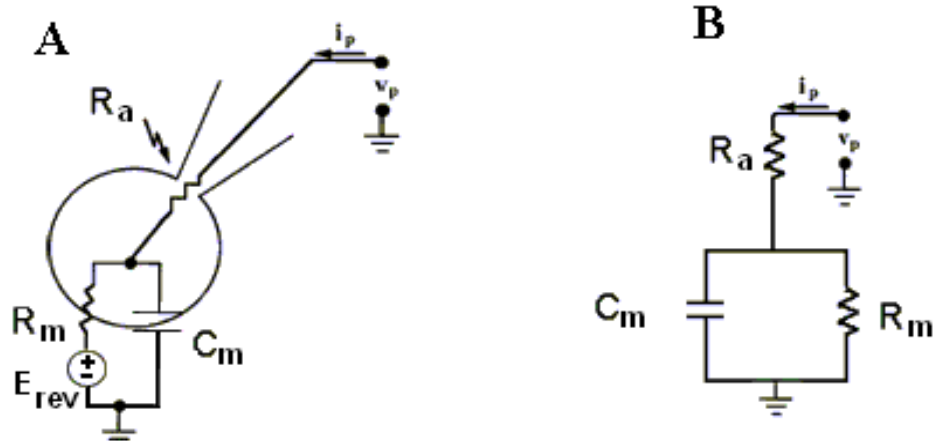
### 4.2.2 Circuito equivalente de la célula y medición de capacitancia celular

Utilizando la técnica de *patch clamp* en modo *voltaje clamp*, además de las corrientes iónicas que atraviesan la membrana pueden medirse otros parámetros eléctricos, como la capacitancia, mediante el análisis del circuito equivalente de la célula. La resolución que tiene esta técnica para medir cambios de capacitancia puede llegar al orden del femtofaradio ( $10^{-15}$  F) en condiciones experimentales óptimas, permitiendo detectar la fusión de vesículas aisladas. Además, posee una resolución temporal del orden de mseg. La desventaja de esta técnica como medida de la exocitosis es que se mide el cambio total de superficie celular, el que puede resultar de un proceso de exocitosis, de endocitosis o de ambos combinados si ocurriesen simultáneamente. En este último caso se estaría midiendo la diferencia entre estos dos procesos, sin poder definir el valor de uno u otro. Sin embargo la endocitosis suele ser mucho más lenta ( $> 1$  seg) que la exocitosis (pocos mseg), con lo cual para estímulos breves la exocitosis y la endocitosis pueden ser separadas cinéticamente (Gillis y col., 1983).

La validez de las técnicas para estimar la capacitancia de membrana depende de que el circuito equivalente eléctrico asumido se aproxime al real de la célula en la configuración *whole cell*. Un modelo muy simple se aplica para células pequeñas y de forma aproximadamente esférica, como lo son las células cromafines. Este modelo consta de una resistencia de acceso  $R_a$  en serie con un modelo celular en el que la célula se comporta eléctricamente como una resistencia  $R_m$  en paralelo con una capacidad  $C_m$ . En este modelo se supone que la capacidad de la pipeta ha sido completamente compensada (Figura 4.4B). La  $R_m$  está asociada con las resistencias que ofrecen los canales iónicos y su valor está determinado por el estado de actividad de los mismos, siendo su valor en reposo del orden del  $1\text{G}\Omega$ . La capacidad de la membrana plasmática,  $C_m$ , es aproximadamente  $1\mu\text{F}/\text{cm}^2$ , suponiendo un espesor uniforme de 5 nm para la membrana y una constante dieléctrica relativa entre 2 y 3. En las células cromafines la capacidad total suele estar entre 3-10 pF (valores experimentales). La resistencia de acceso  $R_a$  es la resultante de la resistencia de la punta de la pipeta más contribuciones de la membrana adherida a consecuencia de la ruptura del sello. El valor de esta resistencia de acceso es típicamente de alrededor de  $10\text{M}\Omega$  (Gillis, 1983). Bajo este modelo, la corriente de membrana ( $I_m$ ) tiene una parte iónica ( $I_{\text{ión}}$ ) y una capacitiva (4.1).

$$I_m = I_{ion} + C_m \frac{dV}{dt} \quad (4.1)$$

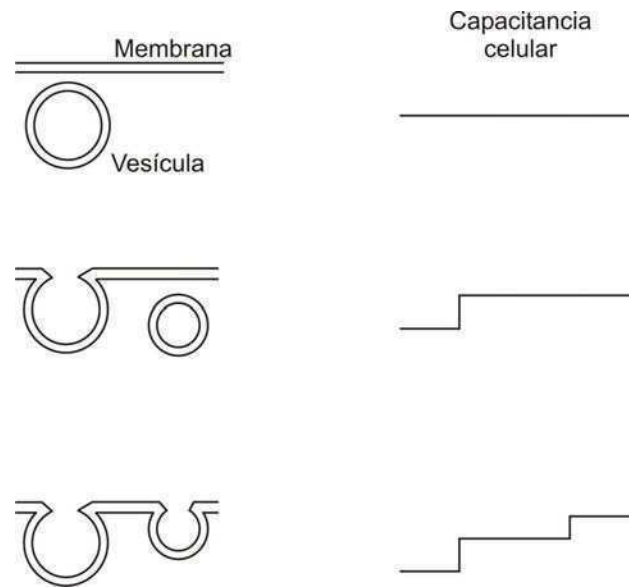
donde  $V$  es el potencial aplicado,  $I_m$  es la corriente que circula por la membrana.



**Figura 4.4-** (A) Circuito equivalente para una célula de forma esférica bajo configuración whole cell. Este modelo tiene en cuenta la capacidad celular de la membrana  $C_m$ , la resistencia de los canales iónicos  $R_m$ , y de la resistencia de acceso  $R_a$ ,  $V_p$  es el voltaje entre la pipeta y el baño (conectado a tierra) e  $I_p$  es la corriente que circula por la pipeta. (B) Esquema del modelo simplificado que se utiliza para calcular la capacidad.

En condiciones de *voltage clamp* el potencial de membrana se mantiene constante. Esto permite que el segundo término de la corriente se anule (4.1) y por lo tanto la corriente medida sea sólo iónica. Únicamente cuando se modifica el potencial, la corriente capacitiva va a aportar pero con un transitorio de muy corta duración, y entonces la corriente iónica de  $Ca^{2+}$ , de evolución mucho más lenta, casi no se ve afectada.

La configuración *whole cell* permite cuantificar el número de las vesículas que se fusionan en cualquier punto de la membrana celular (exocitosis) a través de la medición de su capacidad. A medida que se estimula a la célula con pulsos despolarizantes que provocan la activación de corrientes de  $Ca^{2+}$ , se observa un aumento en la capacidad celular como consecuencia de la fusión de las vesículas con la membrana plasmática (Figura 4.5) (Neher y Marty, 1982).



**Figura 4.5:** Un modo de cuantificar la exocitosis es a través de la medición de la capacitancia celular. A medida que se estimula a la célula con pulsos despolarizantes se observa un aumento en la capacitancia celular como consecuencia de la fusión de las vesículas con la membrana plasmática. En las células cromafines se estimó que el tamaño de una vesícula es de 1,3 fF (Moser y Neher, 1997b).

#### 4.2.3 Métodos para calcular los componentes del circuito equivalente

Suponiendo la validez del circuito modelo de la célula que se muestra en la figura 4.4B se pueden estimar los valores de la capacidad y la resistencia de la membrana. Para ello se desarrollaron métodos que aseguran una buena resolución en la medición de la capacitancia celular que es la que nos permite estudiar el proceso de exocitosis. El método más utilizado, por ser el de mejor resolución temporal emplea una onda sinusoidal de frecuencia  $\omega_c$ , sobre el valor del potencial. A partir de la corriente resultante después de aplicar este patrón de voltaje se pueden estimar los parámetros del circuito equivalente. La técnica que se denomina *piecewise linear* fue la primera en utilizarse para mediciones de alta resolución temporal de cambios en  $C_m$  relacionados con exocitosis (Neher y Marty, 1982). Este método se basa en la aproximación que pequeños cambios en los parámetros ( $R_m$ ,  $R_a$  y  $C_m$ ) inducen en cambios lineales en la corriente. La linealización de la corriente se obtiene cuando se aproxima  $\Delta I / \Delta C_m$  por la derivada parcial:  $\partial I / \partial C_m = V \partial Y / \partial C_m$ , donde  $V$  es la amplitud del voltaje sinusoidal e  $Y$  es la admitancia del circuito equivalente. Considerando el efecto de los

cambios en  $R_a$  y  $R_m$ , además de  $C_m$  en la corriente, los cambios en la corriente sinusoidal están dados por:

$$\Delta I \cong \left( \frac{\partial Y}{\partial R_m} \Delta R_m + \frac{\partial Y}{\partial R_a} \Delta R_a + \frac{\partial Y}{\partial C_m} \Delta C_m \right) V \quad (4.2)$$

La expresión de la admitancia,  $Y$ , basándonos en el modelo descrito es una cantidad compleja cuya expresión, basándonos en el circuito de la figura 4.4B es:

$$Y(\omega) = \frac{1 + j\omega R_m C_m}{R_t (1 + j\omega R_p C_m)} \quad \begin{aligned} R_t &= R_m + R_a \\ R_p &= \frac{R_m R_a}{R_m + R_a} \end{aligned} \quad (4.3)$$

así, las derivadas parciales quedan:

$$\begin{aligned} \frac{\partial Y}{\partial C_m} &\approx j\omega_c T^2(\omega_c) & T(\omega) &= \frac{R_m}{R_t (1 + j\omega_c R_p C_m)} \approx (1 + j\omega_c R_a C_m)^{-1} \\ \frac{\partial Y}{\partial R_a} &\approx -\left(\frac{1}{R_m} + j\omega_c C_m\right)^2 T^2(\omega_c) \\ \frac{\partial Y}{\partial R_m} &\approx -\frac{T^2(\omega_c)}{R_m^2} \end{aligned} \quad (4.4)$$

En la expresión para  $T(\omega)$  estamos suponiendo que  $R_m \gg R_a$  y entonces  $R_t \sim R_m$  y  $R_p \sim R_a$ . Reemplazando la ecuación 4.4 en 4.2, teniendo en cuenta que la frecuencia de la sinusoidal cumple con  $\omega_c \gg 1/R_m C_m$ , se puede separar la corriente en una parte compleja relacionada con los cambios en la capacitancia, y una real relacionada con los de resistencia. Bajo esta suposición,  $T(\omega)$  es una función real y sólo representa un factor de atenuación.

$$\Delta I \cong T^2(\omega_c) \left( \Delta R_a \omega_c^2 C_m^2 + j\omega_c \Delta C_m - \frac{\Delta R_m}{R_m^2} \right) V \quad (4.5)$$

Para cuantificar los cambios de capacitancia y en las resistencias, se separan las dos componentes de la corriente utilizando un *software* o un *lock-in amplifier* en la fase

adecuada. La aproximación que se hizo en este método ( $\omega_c \gg 1/R_m C_m$ ) hace que resulte sensible a cambios en la resistencia de membrana, la que se ve altamente afectada cuando los canales iónicos están abiertos. Por lo tanto este análisis no es válido durante una despolarización que active canales iónicos.

#### **4.2.4 Dispositivo de patch clamp**

El dispositivo experimental utilizado está formado por un microscopio NIKON DIAPHOT TMD, que es el sistema óptico que permite la visualización del preparado; un sistema de micromanipuladores motorizados en tres dimensiones, que es un sistema mecánico estable que permite manipular la posición del microelectrodo respecto de la célula; un amplificador de *patch clamp* EPC7 (Heka Elektronik) y un sistema conversor A/D D/A (Axon Instruments, Digidata 1200), que permiten controlar el voltaje aplicado, medir y amplificar las corrientes generadas y adquirir las mediciones durante los experimentos. El software utilizado, Jclamp (Sci Soft, Branford, CT, USA), permite seleccionar el método para calcular la capacitancia, diseñar el protocolo de pulsos utilizado para las mediciones, seleccionar la frecuencia de adquisición y visualizar y analizar tanto las corrientes generadas como los cambios de capacitancia que se producen. Este software utiliza un método para calcular la capacitancia basado en el *piecewise linear* (Neher y Marty, 1982) explicado en la sección anterior, y la fase adecuada se obtiene mediante el mismo software mediante una técnica que se denomina *phase tracking* (Fidler y Fernandez, 1989). El microscopio utilizado está además equipado con una lámpara de mercurio de 100 Watts, *shutters* y cubos de filtros adecuados para poder evaluar la fluorescencia de EGFP.

En los experimentos de *patch clamp* es crucial la estabilidad mecánica y el control del ruido eléctrico, ya que la introducción de los mismos deteriora la calidad de las mediciones. Por lo tanto, cada uno de los componentes del dispositivo utilizado está diseñado para optimizar estas dos variables. Por esta razón el microscopio se ubica sobre una mesa antivibratoria y dentro de una jaula de Faraday. Para llevar la pipeta hasta la célula, que se encuentra en una solución que simula el medio extracelular, se utiliza el micromanipulador a control remoto mencionado, el cual es esencial para realizar los movimientos de la pipeta con una definición por debajo del micrómetro. Todo este sistema debe ser muy estable para evitar la introducción de vibraciones una vez logrado el sello.

El microelectrodo se conecta a un preamplificador o *headstage*, que está fijado al micromanipulador y conectado con el amplificador principal. El preamplificador de *patch*

*clamp* es un convertidor de corriente a voltaje, o sea el voltaje de salida es proporcional a la corriente de entrada. En la figura 4.6 se observa un esquema del recorrido de la información



durante las mediciones.

**Figura 4.6-** La señal que le llega a la célula por medio del electrodo conectado al amplificador de patch clamp se controla con el software. La respuesta celular es filtrada, digitalizada y finalmente el software permite el cálculo de los parámetros del circuito equivalente.

Por el microelectrodo circula inicialmente corriente iónica y para ser medida se debe transformar en corriente electrónica, para eso se utilizan electrodos de plata con una recubierta de cloruro de plata. Si los electrones van desde el preamplificador al alambre de plata se produce la conversión de  $\text{Ag}^+$  a  $\text{Ag}^0$ , mientras que los iones de  $\text{Cl}^-$  del  $\text{ClAg}$  se hidratan y entran en la solución. Si los electrones fluyen en la dirección contraria, los átomos de  $\text{Ag}^0$  en el electrodo se oxidan a  $\text{Ag}^+$  y se combinan con los cloruros que están en la solución para formar  $\text{AgCl}$ . Como la corriente debe fluir por todo el circuito, si no hubiese iguales concentraciones de iones de cloro en el baño y en la pipeta, habrá una diferencia de potencial llamada *junction potential*. Este potencial no representa problemas si la diferencia es pequeña ya que es posible compensarla electrónicamente con un potencial continuo de polaridad opuesta.

#### 4.2.5 Preparación de micropipetas

Para construir las micropipetas se utilizaron capilares de borosilicato de paredes anchas (1,5 mm diámetro externo x 0,86 mm diámetro interno-HARVARD APPARATUS). Las



pipetas construidas con este tipo de capilares generan poco ruido y tienen valores bajos de capacitancia parásita. Estas pipetas se construyeron con un *puller* horizontal (SUTTER P-97), mediante un protocolo de cinco pulsos de calor y estiramiento sucesivos hasta conseguir la forma adecuada. Luego se les pulió la punta sometiendo a calor de una resistencia durante unos segundos. Los valores de resistencia de electrodo que se utilizaron fueron entre 3 y 5 MΩ. Una fuente de ruido posible en las mediciones es el efecto capacitivo que se produce cuando la solución en la que está inmersa la pipeta trepa sobre sus paredes (Gillis, 1995). Este efecto, puede ser reducido aumentando el ancho de la pared de la pipeta con un material hidrofóbico. Para esto se utilizó cera odontológica dura, a unos 10-20 μm de la punta.

#### 4.2.6 Soluciones experimentales para los experimentos de patch clamp

Una vez establecida la configuración *whole cell*, la solución introducida en la pipeta (llamada normalmente solución interna) entrará en el citosol. Por lo tanto, esta solución debe contener aproximadamente los componentes solubles que se encuentran en el citosol de las células, de modo de poder simular las condiciones fisiológicas durante la medición (ver Tabla 4.1). Se deben mantener aproximadamente las concentraciones iónicas, el pH correcto, la osmolaridad correcta y la célula necesita ser provista de ATP. Para eliminar las corrientes de K<sup>+</sup> se reemplaza el K<sup>+</sup> por Cs<sup>+</sup>, manteniendo la osmolaridad y la fuerza iónica. La solución externa que baña las células también debe contener aproximadamente las concentraciones fisiológicas del líquido extracelular (ver Tabla 4.1). Para bloquear las corrientes de Na<sup>+</sup> se usó tetrodotoxina, (TTX).

<i>Solución interna</i>	<i>Concentración final</i>	<i>Solución externa</i>	<i>Concentración final</i>
<i>Hepes, pH 7.2</i>	<i>23 mM</i>	<i>Hepes, pH 7.2</i>	<i>20 mM</i>
<i>Cs-Glut</i>	<i>95 mM</i>	<i>Glucosa</i>	<i>30 mM</i>
<i>CsCl</i>	<i>30 mM</i>	<i>CaCl</i>	<i>5 mM</i>
<i>NaCl</i>	<i>8 mM</i>	<i>NaCl</i>	<i>120 mM</i>
<i>MgCl<sub>2</sub></i>	<i>1 mM</i>	<i>MgCl<sub>2</sub></i>	<i>4 mM</i>
<i>Cs-EGTA</i>	<i>0,5 mM</i>	<i>TTX</i>	<i>1 μM</i>

<i>Mg-ATP</i>	<i>2 mM</i>		
<i>GTP-Li</i>	<i>0,3 mM</i>		

**Tabla 4.1:** Soluciones utilizadas para la medición de capacitancia. En las dos primeras columnas se detallan los componentes y las concentraciones finales de la solución interna. Esta solución se introduce en la micropipeta y una vez en la configuración *whole cell*, la misma, se introduce en el citosol. Por esta razón, sus componentes deben simular los componentes fisiológicos celulares. En las últimas columnas los componentes y la concentración final de la solución en la que se bañan las células.

En los experimentos en los que se modificó la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  libre en la solución interna, se agregó una determinada concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  total teniendo en cuenta los diferentes *buffers* de  $\text{Ca}^{2+}$  presentes (2 mM de ATP, 3 mM de  $\text{ClMg}^{2+}$  y 0,5 mM de EGTA) (Tabla 4.2). La cantidad necesaria de  $\text{Ca}^{2+}$  total a agregarse se calculó con el software *Frion* (provisto por el Dr. Jonathan Monck).

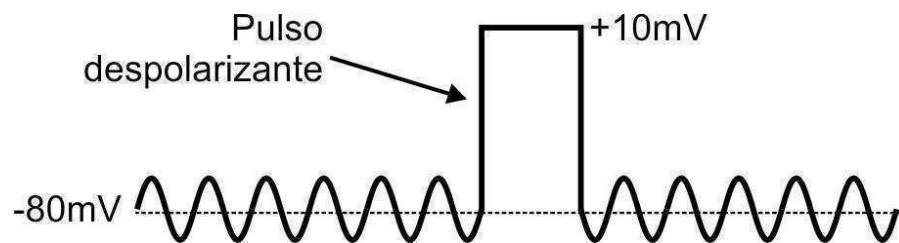
$[\text{Ca}^{2+}]$ libre [nM]	$[\text{Ca}^{2+}]$ agregado [ $\mu\text{M}$ ]
100	185
200	270
500	374
700	403

**Tabla 4.2-** En esta tabla se muestran la  $[\text{Ca}^{2+}]$  agregada a la solución intracelular para obtener la concentración libre deseada compatible con los *buffers* presentes en la solución interna.

#### 4.2.7 Protocolos de estimulación utilizados para la medición de la capacitancia celular

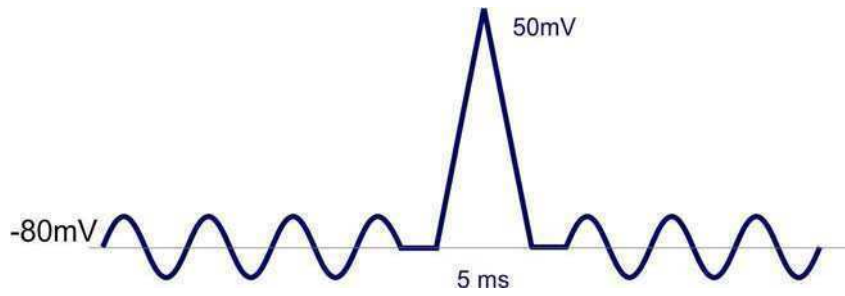
Luego de alcanzar la configuración *whole cell* se aplicó a las células un potencial de mantenimiento o *holding* de -80 mV. Las mediciones se iniciaron aproximadamente 1 minuto después de haber alcanzado esta configuración. Los protocolos para medir capacitancia celular ( $C_m$ ) parten desde el potencial de *holding*, al que se le suma la sinusoidal que permite la estimación de la resistencia y la capacitancia. Sobre el potencial de *holding* se aplica una

cierta secuencia de pulsos despolarizantes para activar los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  y en consecuencia generar la exocitosis. Durante las despolarizaciones se suspende la aplicación de la función sinusoidal. Las mediciones de capacitancia se realizaron con una resolución de 2,56 mseg y una amplitud de la sinusoidal de  $\pm 40$  mV. Estos valores se obtuvieron a partir de mediciones del ruido, buscando los parámetros óptimos para su minimización. Los pulsos despolarizantes cuadrados van desde el potencial de *holding* de -80 mV hasta 10 mV donde las corrientes entrantes de calcio son máximas (ver figura 1.5 introducción). En la figura 4.7 se muestra un esquema del patrón de voltaje que se aplica para medir la capacitancia en respuesta a una despolarización, que en este ejemplo es un pulso cuadrado.



**Figura 4.7-** En la figura se esquematiza el patrón de voltaje aplicado para medir la exocitosis como la diferencia de capacitancia. La onda sinusoidal permite la medición de la capacitancia celular y el pulso despolarizante genera la apertura de los canales de calcio que en consecuencia generan la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  y la exocitosis.

En esta tesis se aplicaron distintos protocolos de estimulación que son indicados correspondientemente en los resultados. Entre los protocolos utilizados están los pulsos cuadrados individuales con duraciones entre 5 mseg y 150 mseg y una despolarización que simula un PA. El protocolo que simula un potencial de acción (PAs) está formado por una rampa que parte del potencial de reposo en -80 mV y llega hasta un potencial de +50 mV en 2,5 mseg y luego vuelve al potencial de reposo en el mismo tiempo (Chan y col., 2005) (Figura 4.8).



**Figura 4.8-** Despolarización que simula un potencial de acción.

Tanto los pulsos cuadrados como los PAs, fueron aplicados en forma aislada o en forma de trenes a distintas frecuencias. Por último, protocolos de pulsos cuadrados pareados se utilizaron para la cuantificación de *pools* vesiculares específicos, lo cual es explicado a continuación.

### 3.2.7.1 Protocolo de pulsos pareados

El grado de exocitosis secuencial de los diferentes *pools* vesiculares liberables de las células cromafines será dependiente de la intensidad de la estimulación. Un protocolo de pulsos pareados, ya validado por la literatura fue utilizado para cuantificar los tamaños del IRP y del RRP. El mismo consta de dos pulsos de despolarización de la misma duración y al mismo potencial, separados por un tiempo fijo. La duración de los pulsos se debemodificar dependiendo del *pool* que se quiere cuantificar. Este protocolo permite, mediante un modelo muy sencillo, que utiliza los aumentos de capacitancia asociados a estos pulsos, acotar el tamaño del *pool* en cuestión entre un valor máximo  $B_{máx}$  y uno mínimo  $B_{mín}$  (Gillis y col., 1996; Voets y col., 1999).

Este modelo se basa en la existencia de un *pool* de tamaño  $B_0$ , del que se fusiona una fracción  $\alpha_1$  mayor al 50% con el primer pulso. En consecuencia, el primer pulso produce un cambio de capacitancia  $\Delta C_{m1} = \alpha_1 B_0$ .

Suponiendo que no hay relleno del *pool*  $B_0$  entre estímulos por la movilización de vesículas de otros grupos vesiculares situados río arriba, el segundo pulso libera una proporción  $\alpha_2$  de lo que queda, o sea:

$$\Delta C_{m2} = \alpha_2 (B_0 - \Delta C_{m1}) = \alpha_2 (1 - \alpha_1) B_0 \quad (4.6)$$

Donde  $\Delta C_{m2} < \Delta C_{m1}$ , si el primero generó una exocitosis suficiente como para agotar parcialmente al *pool*. Ahora, si definimos  $S = \Delta C_{m1} + \Delta C_{m2}$  y  $R = \Delta C_{m2} / \Delta C_{m1}$ , podemos expresar  $B_o$ , el tamaño del *pool*, en función de estos parámetros (4.7).

$$B_o = \frac{S}{\left(1 - \frac{\alpha_1}{\alpha_2} R\right)(1 + R)} \quad (4.7)$$

Si pudiéramos asegurar que en ambas estimulaciones se induce la misma entrada de calcio y que cada pulso libera la misma fracción ( $\alpha_1 = \alpha_2$ ), el valor del tamaño del *pool* inicial se podría calcular exactamente por la ecuación (4.8), en la cual se supuso que  $\alpha_1$  es igual a  $\alpha_2$ . Sin embargo esta suposición es posiblemente falsa, ya que puede perdurar en el citosol una cierta cantidad de calcio residual luego del primer pulso, provocando que la fracción liberada en el segundo pulso sea mayor que en el primero, o sea  $\alpha_2 > \alpha_1$ . En este caso, la ecuación (4.8) estaría sobreestimando el valor real, por esta razón se considera a este valor una cota superior del *pool* evaluado y se lo denomina  $B_{m\acute{a}x}$ .

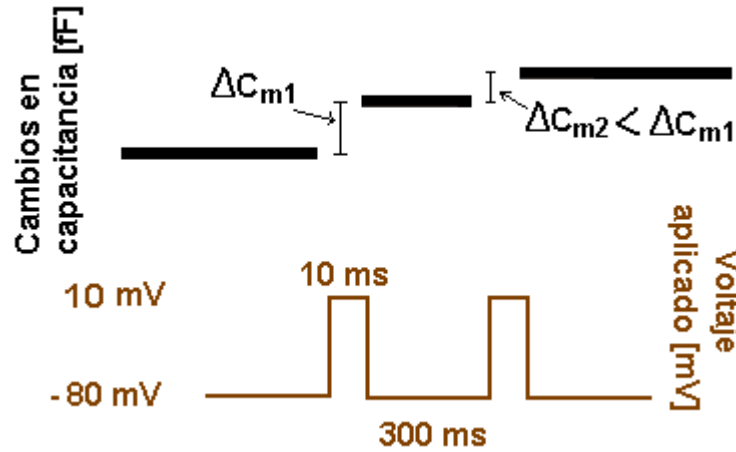
$$B_{m\acute{a}x} = \frac{\Delta C_{m1} + \Delta C_{m2}}{1 - \left(\frac{\Delta C_{m2}}{\Delta C_{m1}}\right)^2} \quad (4.8)$$

Por otro lado, resulta lógico asumir que el valor mínimo que puede tomar el tamaño del *pool*,  $B_{m\acute{i}n}$  es la simple suma de los cambios en capacitancia provocados por ambos pulsos (4.9).

$$B_{m\acute{i}n} = \Delta C_{m1} + \Delta C_{m2} \quad (4.9)$$

La aplicación de este protocolo para estimar el IRP consiste en dos pulsos de 10 mseg separados por 300 mseg (Figura 4.9). Mientras que para el RRP los pulsos son de 100 mseg con la misma separación. El tiempo entre pulsos de 300 mseg fue establecido de forma de minimizar el rellenado del *pool* por la movilización de vesículas de otros grupos vesiculares (Gillis y col., 1996). Para que la estimación de los tamaños de los *pools* sea exacta es necesario que el  $\Delta C_{m2}$  sea mayor a  $\Delta C_{m1}$  o lo que es lo mismo que  $R$  sea menor a

1. En los promedios experimentales se utilizaron sólo los experimentos en los que se cumple que  $R$  es menor a 0,7.



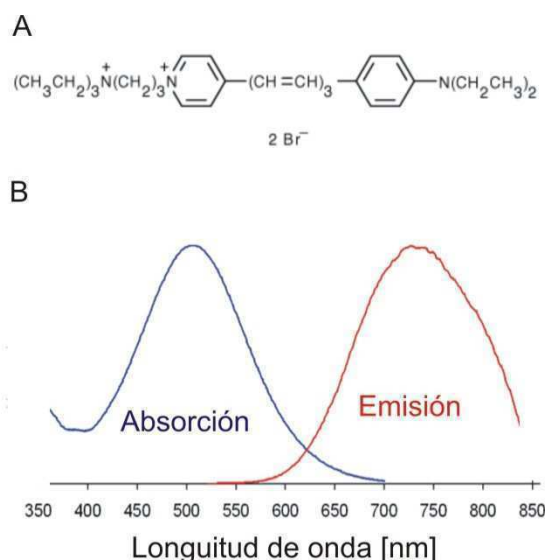
**Figura 4.9-** Esquema del modelo de dos pulsos para la estimación del IRP. El protocolo aplicado consta de dos pulsos despolarizantes desde en valor de reposo,  $-80$  mV hasta  $10$  mV. Según el modelo, ante iguales entradas de calcio, la respuesta en capacitancia del segundo pulso es menor a la del primero debido al agotamiento del IRP.

### 4.3 Técnica de imaging con FM

#### 4.3.1 Características de los fluofóforos tipo FM

Las familia de fluoróforos de tipo FM, “styryl dyes”, son moléculas anfipáticas, con una región hidrofílica o “cabeza” polar cargada positivamente en un extremo y otra hidrofóbica o “cola” compuesta por dos cadenas hidrocarbonadas en el otro (Betz y Bewick, 1992; Betz y col., 1996). La cabeza posee un grupo piridina que está unido por un puente de doble enlace a un anillo aromático, lo que constituye la parte fluorescente del colorante. La cola de estos fluoróforos es de suma importancia. Primero, es la región del fluoróforo que le permite insertarse en la hemicapa externa de la membrana plasmática de la célula y en segundo lugar, la interacción de esta cola hidrocarbonada con la membrana plasmática produce un cambio en las propiedades fluorescentes de la molécula. Esta propiedad las hace muy útiles para el estudio de la exocitosis, endocitosis y el tráfico de vesículas ya que cuando se particionan en forma reversible en la membrana, su fluorescencia aumenta hasta unas 400

veces más que en solución acuosa. El miembro de la familia utilizado en esta tesis es el FM 4-64, cuya estructura química se muestra en la figura 4.10A. Este fluoróforo es excitado a longitudes de onda centradas en 480 nm, mientras que su emisión máxima es a 740 nm (Figura 4.10B).



**Figura 4.10** - Características del FM4-64. (A) La estructura del FM4-64. Es un fluoróforo de tipo anfipático, con una región hidrofílica, “cabeza polar”, cargada positivamente en un extremo y otra hidrofóbica, “cola”, compuesta por dos cadenas hidrocarbonadas en el otro. (B) En la figura se muestran los espectros de absorción y emisión del FM 6-64.

### 4.3.2 Dispositivo experimental

Las células fueron colocadas en una cámara de perfusión con solución estándar, sobre la platina de un microscopio Olympus IX81 (preparado para mediciones de epifluorescencia convencional). La preparación se iluminó con una lámpara de mercurio de 100 Watts, y se observó con un objetivo Olympus X60 de inmersión en aceite (con una apertura numérica de 1,4). Se utilizó un filtro de excitación pasa banda (560/55 nm) y un filtro de emisión pasa banda de 645/75 nm. Las imágenes fueron tomadas con una cámara Cool Snap HQ<sub>2</sub>, y adquiridas mediante el software Metamorph versión 8.0. Se adquirieron imágenes de 512 x 512 píxeles. Para reducir el *fotobleaching* se redujo el tiempo de exposición lo máximo posible (a 100 mseg), sin afectar la calidad de las imágenes adquiridas.

### ***4.3.3 Soluciones utilizadas***

Para los experimentos de fluorescencia se utilizaron dos soluciones, la de lavado y la de estimulación con alto  $K^+$  cuya composición se detalla a continuación:

**Solución standard (mM):** 145 NaCl, 5.6 KCl, 1,2 MgCl, 10 HEPES, 2 CaCl, 10 dextrosa.

**Solución de estimulación (mM):** se reemplazan, en la solución de lavado, 50 mM de NaCl por 50 mM de KCl.

El FM4-64 se adiciona a la solución de lavado o a la estimulación a una concentración final de 5  $\mu$ M.

### ***4.3.4 Protocolo básico para la medición de exocitosis***

En el laboratorio se desarrolló un protocolo pensado para poder estimar la exocitosis, endocitosis y reciclado vesicular durante un mismo experimento frente a despolarizaciones inducidas por un pulso de 50 mM de KCl (Perez Bay y col., 2007). Se observó que este estímulo, aplicado durante 3 minutos, es capaz de liberar una proporción importante del *pool* liberable de vesículas que corresponde a un 20 % la membrana celular (Perez Bay y col., 2007). En esta tesis, esta metodología se utilizó solamente para estimar la exocitosis, y por lo tanto se usó sólo la primera parte de este protocolo (Perez Bay y col., 2007). Esta metodología experimental se basa en que al aplicar el fluoróforo externamente, su fluorescencia aumenta dramáticamente cuando este se particiona en la membrana, siendo la fluorescencia emitida proporcional a la superficie de membrana (Smith y Betz, 1996; Lagnado y col., 1996). Una vez se alcanza un estado estacionario en la fluorescencia celular se aplica la solución de alto potasio (también en presencia de FM) que produce la despolarización de la membrana y la consecuente exocitosis. Al producirse la fusión de vesículas, la membrana interna de estas vesículas se pone en contacto con la solución extracelular que contiene el fluoróforo y por lo tanto el fluoróforo ingresa a la membrana. La cantidad de FM insertado en la membrana, y en consecuencia la señal fluorescente, aumenta proporcionalmente a la exocitosis.

El protocolo para la medición de la exocitosis consta de los siguientes pasos:

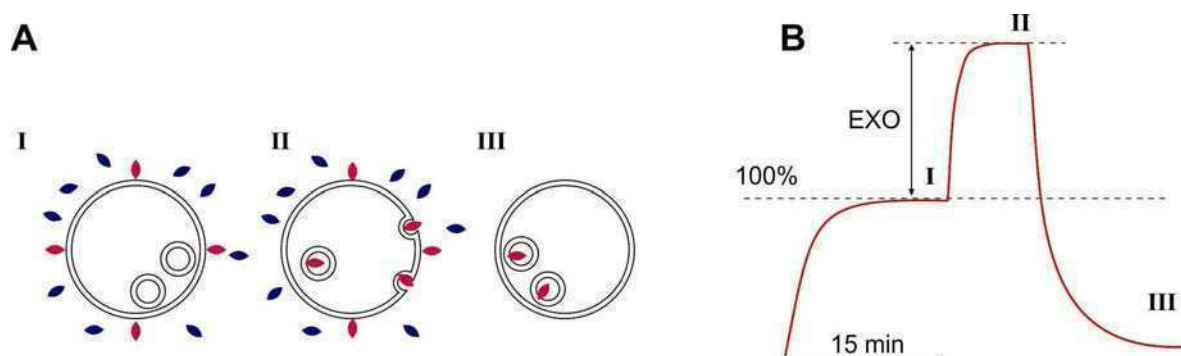


**Pre-incubación:** Se incuban las células con solución *standard* con FM4-64 a una concentración final de 5  $\mu$ M, durante 15 minutos y posteriormente se cambia a la solución *standard* sin fluoróforo por 30 minutos. Al finalizar el lavado la marca que permanece corresponde al marcado inespecífico.

**Incubación:** Se aplica la solución *standard* conteniendo FM4-64 nuevamente durante otros 15 minutos, que es el tiempo necesario para que la señal de fluorescencia alcance una medición estable. El valor de fluorescencia al que llega es tomado como el 100% de la membrana marcada (Figura 4.11 A (I) ).

**Estimulación:** La despolarización de la membrana se induce con una solución con  $K^+$  50 mM durante 3 minutos, en presencia del fluoróforo. Esto induce exocitosis y consecuentemente se observa un aumento en la fluorescencia (Figura 4.11 A (II) ).

**Lavado:** Finalmente el fluoróforo es lavado con solución *standard* durante 30 min. En consecuencia, el fluoróforo es removido de la membrana plasmática pero no de la fracción de membrana que había sido internalizada por endocitosis durante el período de estimulación (Figura 4.11 A (III) ). En este trabajo la fase correspondiente a la evaluación de la endocitosis no fue analizada.



**Figura 4.1-** Protocolo para la medición de la exocitosis mediante la fluorescencia de FM4-64. (A) En esta figura se esquematizan las distintas fases del protocolo de medición de la exocitosis utilizando el fluoróforo FM 4-64. El fluoróforo insertado en la membrana (color rojo) flúorese 400 veces más que en la solución acuosa (color azul) **I:** Al terminar de incubarse con solución *standard* con FM4-64 por 15 minutos se llega a un equilibrio estable que se considera arbitrariamente como el 100%. **II:** La estimulación de 3 min con  $K^+$  50 mM aun en presencia del fluoróforo provoca un aumento de

fluorescencia que se debe a la fusión de vesículas y al consecuente aumento de FM4-64 que se incorporó a la membrana. **III:** Al terminar el período de lavado realizado con solución estándar y en ausencia del fluoróforo. **(B)** En la figura se esquematizan los cambios de fluorescencia esperados en un experimento de medición de la exocitosis por fluorescencia de FM4-64.

## 4.4 Análisis de datos y estadística

### 4.4.1 Procesamiento de los experimentos electrofisiológicos

Los resultados fueron analizados con Microsoft Office Excel 2007 y Origin 7.5 (Microcal Software, Northhampton, MA).

De todas las mediciones realizadas se descartaron aquellas en las cuales la corriente medida, cuando la membrana está en el potencial de *holding* superaba los 30 pA. Esta corriente se debe al flujo de iones que se produce cuando el sello no es bueno y se la conoce como “corriente de fuga”. El valor promedio de los *RMS* en las mediciones fue de 6 fF, mientras que los valores de las resistencias en serie variaron entre 10 y 15 MΩ.

Las integrales de las corrientes experimentales generadas por pulsos despolarizantes de distintas duraciones desde 5 hasta 150 mseg se calcularon mediante la multiplicación del pico de la corriente por la duración del pulso. El error que se introduce al hacer esta aproximación para pulsos cortos está relacionando con que las corrientes de  $\text{Ca}^{2+}$  tardan un tiempo en llegar a su valor máximo, este tiempo se estimó en un valor entre 5 - 7 mseg en las células cromafines de rata (Hollins y Ikeda, 1996). Por lo tanto la sobreestimación debería ser más notoria a pulsos cortos menores a 10 mseg. Para estimar el error cometido se compararon los promedios de los valores de integrales de 26 ejemplos que fueron medidas usando la función de integración del *software* Origin 7.5 y también calculadas por medio de la aproximación mencionada. En el primer caso el promedio fue de 1,13 pC, mientras que en el segundo de 1,21 pC, lo que corresponde a un error del 7 %. En los pulsos largos, probablemente las integrales se sobreestimen debido a la inactivación de las corrientes, sin embargo este efecto empieza a ser importante a partir de pulsos de duraciones mayores a las utilizadas en esta tesis. A un valor de potencial de membrana de -90 mV, la inactivación medida en células cromafines bovinas tiene un tiempo característico de 250 mseg (Bossu y col., 1991).

Para medir los aumentos de capacitancia debidos a cada pulso, se promediaron los valores durante 50 mseg antes y después del pulso. Al terminar el pulso, normalmente la capacitancia muestra un aumento debido a la exocitosis. Sin embargo se debe considerar que inmediatamente luego de finalizado el pulso a veces se observa un cambio transitorio de capacitancia debido a las corrientes de compuerta asociadas a la deactivación de los canales de  $\text{Na}^+$ , efecto que se ve prolongado por la utilización de TTX (Horrigan y Bookman, 1994; Moser y Neher, 1997a). Para evitar una sobreestimación de los cambios de capacitancia por este efecto, en esos casos se promediaron los valores de esta variable empezando entre 50 y 100 mseg después de terminado el pulso.

#### ***4.4.2 Procesamiento de los experimentos de Imaging***

Para analizar las imágenes se utilizó el programa *Image J*, y particularmente una de sus herramientas que permite seleccionar una región de interés con una forma determinada, que puede adaptarse perfectamente a la de la célula cromafín, que es redondeada o elíptica. De esta manera se pudo cuantificar la fluorescencia promedio de la célula completa en unidades arbitrarias, a la que se le sustrajo el valor de fluorescencia basal o *background* para cada cuadro o foto. Para obtener el *background* se utilizó el promedio, para cada cuadro, de tres zonas oscuras cercanas a la célula. Por otro lado, la fluorescencia remanente al final de la etapa de pre-incubación fue sustraída de los valores de fluorescencia que se obtuvieron durante las otras etapas del experimento, ya que esta es una medida del marcado celular inespecífico. Todos los valores obtenidos de los experimentos se expresaron como porcentajes de la señal fluorescente registrada al final del período de incubación con FM4-64 (punto I, figura 4.11B).

#### ***4.4.3 Estadística***

Los resultados experimentales fueron expresados como medias muestrales  $\pm$  su error estándar. Para hacer comparaciones entre dos grupos experimentales, se utilizó el test de Student para dos muestras independientes. Las comparaciones de más de dos muestras independientes se realizaron mediante pruebas de análisis de varianza (ANOVA) realizando a posteriori contrastes de Bonferroni. Estos test se realizaron mediante el software Origin 7.5 (Microcal Software, Northhampton, MA).

## ***4.5 Reactivos y químicos***

La poli-L-lisina, citosina-1- $\beta$ -arabinofuranósido, papaína, la albúmina sérica bovina, el ATP y el GTP se compraron a Sigma (St Louis, MO, EEUU); el medio de cultivo Dulbecco (DMEM), el OPTIMEM, el suero fetal bovino, la gentamicina, penicilina/estreptomicina, son de GIBCO (Carlsbad, CA, EEUU). El fluoróforo (FM4-64) fue adquirido a Molecular Probes (Portland, OR, EEUU). La lipofectammina 2000 es de Invitrogen. La nitrendipina fue adquirida a Tocris Bioscience (park Ellsville, MO, EEUU) y la  $\omega$ -Agatoxina IV A y TTX a Alomone Laboratories (Har Hotzvim Hi-Tech Park, Jerusalem, Israel). SNX-486 de PEPTIDES international. Los plásmidos *synprint* fueron provistos generosamente por el laboratorio del Dr. Gerald Zamponi (University of Calgary. School of Medicine. Calgary, Canadá).

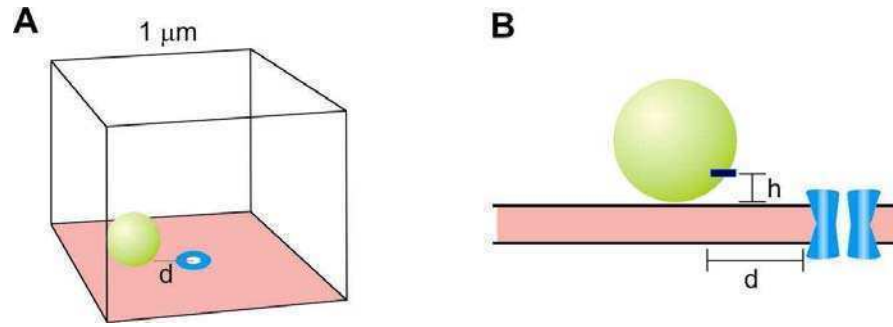
## ***4.6 Simulaciones computacionales***

En esta tesis se realizaron simulaciones de la dinámica del  $\text{Ca}^{2+}$  y liberación de vesículas para entender el acople de la exocitosis con la estimulación. La simulación contempla la entrada del  $\text{Ca}^{2+}$  por los canales, la difusión tridimensional del  $\text{Ca}^{2+}$  y la liberación de las vesículas.

### ***4.6.1 Geometría***

La simulación está confinada en un compartimento cúbico de 1  $\mu\text{m}$  de lado. Este volumen corresponde a la sección de la célula que se encuentra en contacto con la membrana plasmática, por lo tanto la cara inferior de este cubo simularía la membrana plasmática. Las condiciones de contorno para todos los lados del cubo es de no flujo o reflectiva (Smith GD, 2004).

La entrada de calcio se simula por una fuente única en el centro geométrico de la base del cubo (Figura 4.12A). El sensor de  $\text{Ca}^{2+}$  (S) en las vesículas se ubicó a una distancia fija  $h = 20$  nm de la membrana y a una distancia  $d$  del canal (Figura 4.12B). El volumen de la vesícula no se tiene en cuenta en la simulación.



**Figura 4.12 - (A)** En la figura se representa la geometría cúbica del volumen considerado para la simulación. La fuente de  $\text{Ca}^{2+}$  está ubicada en el centro geométrico de la base del cubo de lado  $1 \mu\text{m}$ . **(B)** Las vesículas se simularon como puntos en el espacio a una distancia  $d$  de la fuente y a una altura  $h$  de la membrana.

#### 4.6.2 Simulación de las corrientes de calcio

Para simular las corrientes de calcio se utilizó un modelo tipo HH de dos compuertas (Borst Sakmann, 1996). Cada compuerta  $m$  tiene una probabilidad  $\alpha$  de pasar de su estado abierto al cerrado, y una probabilidad  $\beta$  para pasar de cerrado a abierto, y ambas dependen del  $V_m$  en forma exponencial (Ecuación 4.10). Las funciones  $\alpha$  y  $\beta$  se obtuvieron de los ajustes de la activación y la desactivación de las corrientes de  $\text{Ca}^{2+}$  a distintos valores de voltaje (Borst Sakmann, 1996). La ecuación 4.11 nos da la probabilidad de que la compuerta  $m$  esté abierta para una estimulación dada ( $V$  en función del tiempo). Suponiendo que la corriente de  $\text{Ca}^{2+}$  está formada por 2 compuertas, la corriente total está dada por la expresión (4.12) donde  $g_{\text{max}}$  y  $V_r$  son la conductancia máxima y el potencial de reversión para el  $\text{Ca}^{2+}$  respectivamente. Estos parámetros se obtienen del ajuste de las curvas IV. Los valores ajustados para el potencial de reversión fue de 46,2 mV y la conductancia máxima fue de 48 nS.

$$\begin{aligned}\alpha_m &= \alpha_0 e^{(V/V\alpha)} \\ \beta_m &= \beta_0 e^{(-V/V\beta)}\end{aligned}\tag{4.10}$$

$$\frac{dm}{dt} = \alpha_m(1-m) + \beta_m\tag{4.11}$$

$$I(t) = m^2 g_{\max} (V - V_r) \quad (4.12)$$

#### 4.6.3 Dinámica del calcio: Difusión y reacción con los buffers

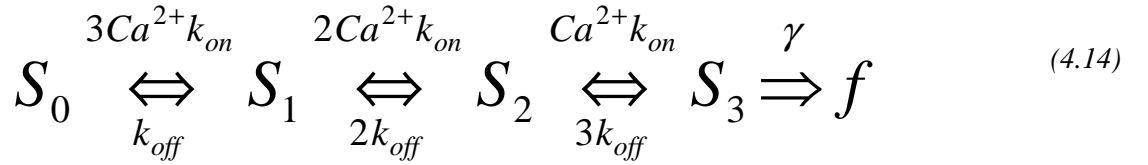
Al ingresar al citosol por los canales, el  $\text{Ca}^{2+}$  difunde y reacciona con los *buffers* fijos y móviles. La evolución temporal de las concentraciones en 3 dimensiones para el  $\text{Ca}^{2+}$  y los *buffers* (B) se describen por las ecuaciones en derivadas parciales en (4.13). Estas ecuaciones se resolvieron por diferencias finitas ADI (Alternating Direction Implicit) con el método implícito y siempre estable de Douglas-Rachford (Ames W F, 1977). En estas ecuaciones  $D_{\text{Ca}}$  representa la constante de difusión del  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $D_B$  la constante de difusión del *buffer*,  $k_{\text{on}}$  y  $k_{\text{off}}$  son las constantes de ligado y desligado del  $\text{Ca}^{2+}$  con el *buffer*,  $[B]$  la concentración de *buffer*,  $F$  es la constante de Faraday y  $\Delta x$  es la resolución espacial de la simulación que fue de 30 nm. El valor que se usó para  $D$  en las simulaciones es de  $220 \mu\text{m}^2/\text{s}$  que fue medido en ovocitos (Allbritton y col., 1992).

$$\begin{aligned} \frac{\partial [\text{Ca}^{2+}]}{\partial t} &= D_{\text{Ca}} \left( \frac{\partial^2 [\text{Ca}^{2+}]}{\partial x^2} + \frac{\partial^2 [\text{Ca}^{2+}]}{\partial y^2} + \frac{\partial^2 [\text{Ca}^{2+}]}{\partial z^2} \right) + R + I \\ \frac{\partial [B]}{\partial t} &= D_B \left( \frac{\partial^2 [B]}{\partial x^2} + \frac{\partial^2 [B]}{\partial y^2} + \frac{\partial^2 [B]}{\partial z^2} \right) + R \\ R &= \sum_i -k_{\text{on}} ([\text{Ca}^{2+}] * [B]^i) + k_{\text{off}} ([B]^i_t - [B]^i) \\ I &= \frac{I_{\text{Ca}}(t)}{F \Delta x^3} \end{aligned} \quad (4.13)$$

En el método de diferencias finitas, las ecuaciones son discretizadas en el espacio y en el tiempo. La longitud total de simulación es dividida en pasos de lado  $\Delta x$  y numerados de 0 a N. La concentración de cada molécula es calculada en cada punto de la grilla para un dado tiempo.

#### 4.6.4 Exocitosis

El proceso de fusión fue modelado como un mecanismo no cooperativo de tres pasos dependientes de  $\text{Ca}^{2+}$  (4.14). Este esquema simula la presencia de un sensor de  $\text{Ca}^{2+}$  ( $S$ ) con tres sitios de interacción donde el subíndice indica el número de calcio ligados al sensor



La probabilidad de pasar de un estado al siguiente es proporcional a la constante  $k_{on}$  por la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$ , medida en la posición del sensor  $Y$  por el número de sitios libres. La probabilidad de volver al estado anterior dependerá del número de sitios libres por la constante  $k_{off}$ , independientemente de la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$ . Cuando los tres  $\text{Ca}^{2+}$  se ligan al sensor la vesícula es liberada ( $f$ ) en forma no reversible con una constante  $\gamma$  (Heinemman y col., 1994). Las constantes utilizadas son  $k_{on}=8 \mu\text{M}^{-1} \text{seg}^{-1}$ ,  $k_{off}=105 \text{seg}^{-1}$  y  $\gamma=1 \text{seg}^{-1}$  que corresponde a un  $K_d=13 \mu\text{M}$  (Heinemman y col., 1994).

## 5 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 5.1 Características del IRP

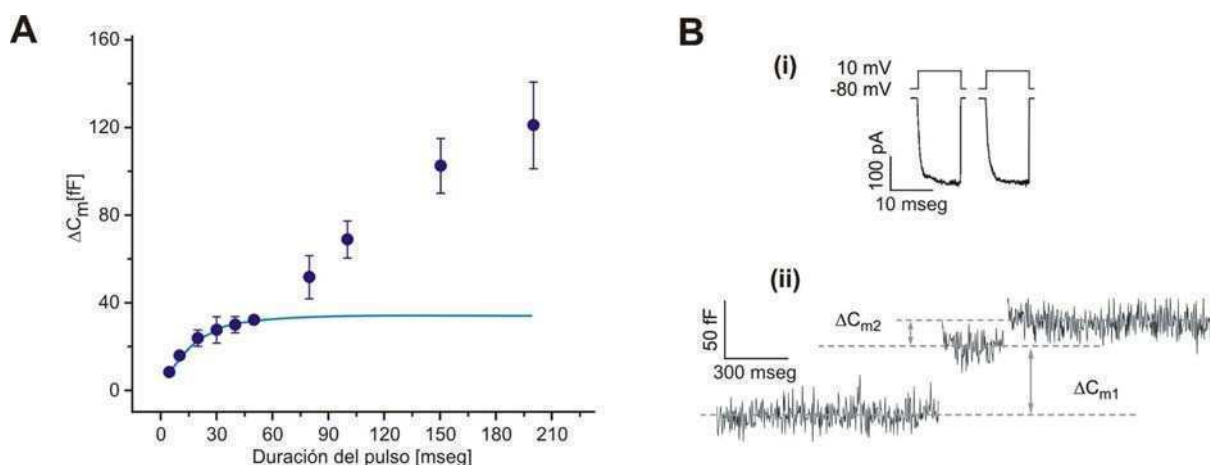
#### 5.1.1 Estimación del IRP

Clásicamente se ha estudiado la respuesta exocitótica a pulsos de duración variable a modo de estudiar *pools* vesiculares con diferente probabilidad de liberación. Una despolarización de mayor duración genera una entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  mayor, que a su vez produce una mayor liberación de vesículas. La exocitosis del IRP fue clásicamente estudiada midiendo los cambios en la capacitancia celular ( $\Delta C_m$ ) en respuesta a despolarizaciones breves con duraciones menores a 100 mseg (Horrigan y Bookman, 1994; Moser y Neher, 1997a; Voets y col., 1999; Marengo, 2005). En este trabajo observamos que la aplicación de pulsos despolarizantes de duraciones crecientes provocan un  $\Delta C_m$  que se incrementa al aumentar la duración del pulso, aproximándose a un valor de saturación para pulsos de 50 mseg (Figura 5.1A). Este comportamiento se interpretó como el resultado del agotamiento del IRP, y el valor de saturación se utilizó como una estimación del tamaño de este *pool* (Horrigan y Bookman, 1994; Voets y col., 1999; Marengo, 2005). Del ajuste de estos datos experimentales con una función exponencial (Horrigan y Bookman, 1994) se obtuvo un valor asintótico de  $33 \pm 1$  fF. Dado que el  $\Delta C_m$  en promedio producido por pulsos de 50 mseg fue muy similar ( $32 \pm 1$  fF,  $n=33$ ), consideramos que este tipo de pulsos proveen una estimación confiable del IRP. A partir del mismo ajuste también se estimó una duración de pulso característico ( $\tau$ ) de  $15,7 \pm 0,8$  mseg, que corresponde a una tasa de liberación ( $1/\tau$ ), de  $64 \text{ seg}^{-1}$ . Por otro lado, la aplicación de pulsos de duraciones mayores a 50 mseg manifestaron una respuesta que se desvía marcadamente de este comportamiento de saturación (Figura 5.1A). Probablemente esto se deba al reclutamiento de vesículas de otros *pools* de mayor tamaño, que pueden estar compuestos por vesículas más distantes de los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  o bien por vesículas que aún deben sufrir alguna etapa de maduración dependiente de  $\text{Ca}^{2+}$  (Horrigan y Bookman, 1994; Marengo, 2005).

Otro método que ha sido utilizado para cuantificar el tamaño del IRP es mediante la aplicación de un protocolo de pulsos pareados de corta duración formado por dos pulsos de 10 mseg separados por 300 mseg (ver sección 4.2.7.1) (Gillis y col., 1996; Voets y col.,



1999; Álvarez y col., 2008). En la figura 5.1B se muestran trazados representativos de las corrientes de  $\text{Ca}^{2+}$  ( $\text{ICa}^{2+}$ ) y de los  $\Delta\text{C}_m$  obtenidos en respuesta a dicho protocolo. Se observó que el aumento de la capacitancia celular inducido por la segunda despolarización ( $\Delta\text{C}_{m2}$ ) es marcadamente menor que el inducido por la primera ( $\Delta\text{C}_{m1}$ ), aun cuando las  $\text{ICa}^{2+}$  activadas en respuesta a ambas despolarizaciones fueron idénticas (Figura 5.1B). Es importante remarcar que las corrientes promedio, provocadas por el primer ( $\text{ICa}^{2+}_1$ ) y segundo pulso ( $\text{ICa}^{2+}_2$ ) no difirieron estadísticamente entre sí ( $\text{ICa}^{2+}_1 = 163 \pm 13$  pA y  $\text{ICa}^{2+}_2 = 160 \pm 15$  pA,  $n=84$ ), mientras que  $\Delta\text{C}_{m2}$  se encontró notablemente deprimido respecto a  $\Delta\text{C}_{m1}$  ( $\Delta\text{C}_{m1} = 23 \pm 1$  fF y  $\Delta\text{C}_{m2} = 9 \pm 1$  fF). Estos aspectos son coherentes con las asunciones del método para calcular el tamaño del IRP, en el cual se considera que las entradas de  $\text{Ca}^{2+}$  producidas por cada pulso deben ser iguales, para que la disminución de exocitosis observada para el segundo pulso se deba exclusivamente al agotamiento del *pool* en cuestión (ver sección 4.2.7.1). Los  $\Delta\text{C}_m$  inducidos por este protocolo fueron utilizados para calcular los límites inferior ( $B_{\min}$ ) y superior ( $B_{\max}$ ) de tamaño para el IRP (ver sección 4.2.7.1) (Voets y col., 1999; Álvarez y col., 2008). Los valores promedio medidos con esta metodología, en condición control, fueron de  $32 \pm 3$  fF y  $41 \pm 3$  fF para  $B_{\min}$  y  $B_{\max}$  respectivamente (Figura 5.2B, valores en EGTA).



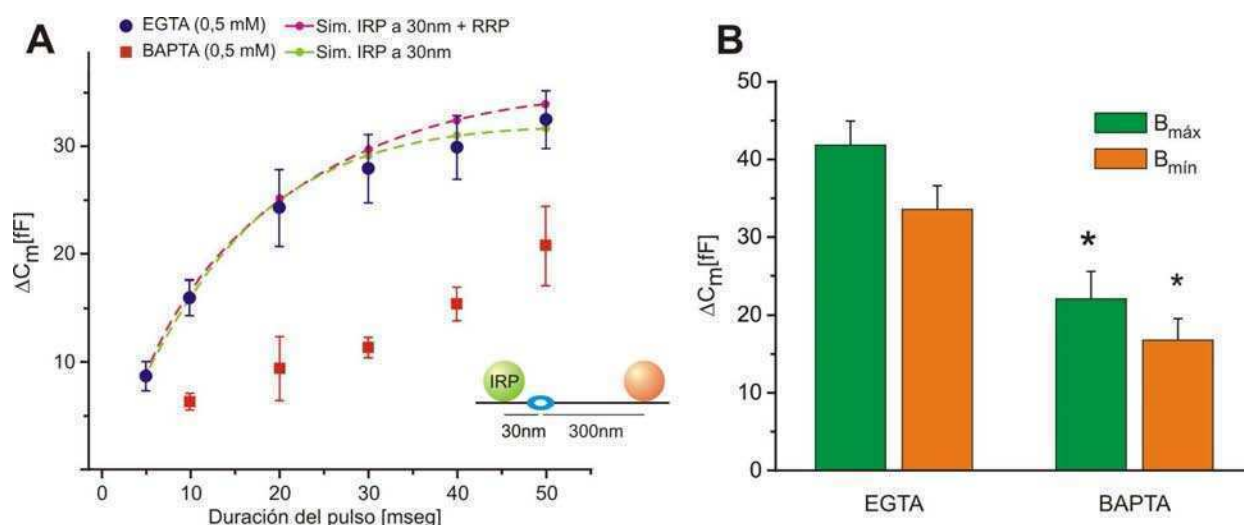
**Figura 5.1 - Estimación del tamaño del IRP.** (A) En esta figura se grafica la relación entre el  $\Delta\text{C}_m$  y la duración de los pulsos despolarizantes únicos entre 5 y 200 msec. El número total de experimentos en esta curva fue de 145. La línea celeste corresponde al ajuste exponencial de la forma  $A \cdot (1 - e^{-t/\tau})$  aplicada sobre los puntos correspondientes a duraciones de pulsos entre 5 y 50 msec. En (B) se muestra un ejemplo representativo de la respuesta obtenida ante el protocolo de pulsos pareados

utilizado para estimar el IRP. (i) Las  $ICa^{2+}$  se muestran alineadas en la misma escala temporal debajo de los pulsos cuadrados de potencial a los que es sometida la célula. (ii) Un trazado representativo de la capacitancia celular en el que se destacan los cambios de capacitancia producidos por el primer pulso ( $\Delta C_{m1}$ ) y el segundo ( $\Delta C_{m2}$ ).

### 5.1.2 Efecto del buffer rápido BAPTA sobre la exocitosis de las vesículas del IRP

La eficiencia de las despolarizaciones breves para evocar la exocitosis depende, además de la proximidad de la maquinaria de fusión a la fuente de  $Ca^{2+}$ , de las propiedades de los *buffers* intracelulares de  $Ca^{2+}$ . Los *buffers* se unen al  $Ca^{2+}$  entrante, reduciendo la cantidad de  $Ca^{2+}$  libre. Entre los *buffers* exógenos intracelulares más comúnmente utilizados están el EGTA (*Ethylene Glycol Tetraacetic Acid*) y el BAPTA (*1,2-Bis(o-AminoPhenoxy)ethane-N,N,N',N'-Tetraacetic Acid*). Estos dos *buffers* se diferencian en su rapidez para quelar el  $Ca^{2+}$ . BAPTA se conoce como un *buffer* rápido ya que tiene una tasa para ligarse al calcio entre 50-160 veces mayor que el EGTA. Sin embargo, ambos tienen un  $K_d$  similar con valores entre 0,1-0,22 (Naraghi y Neher, 1997; Kits y col., 1999; Segura y col., 2000). Por sus características, el BAPTA agregado en la solución intracelular es capaz de ligar al  $Ca^{2+}$  entrante en tiempos muy breves luego de su ingreso al citosol, disminuyendo la concentración de  $Ca^{2+}$  libre en una región muy próxima a los canales. En consecuencia es esperable que reduzca el componente secretorio rápido inducido por los pulsos de corta duración (Adler y col., 1991). Como el IRP estaría compuesto por vesículas que se sitúan cerca de la fuente  $Ca^{2+}$ , este *pool* debería ser más sensible a BAPTA que a EGTA (Moser y Neher, 1997a). Esta hipótesis se evaluó comparando el efecto de ambos *buffers* sobre el tamaño del IRP, siendo agregados ambos a la solución interna en idéntica concentración (0,5 mM) en experimentos independientes. En primer lugar, se estudió el efecto de estos dos *buffers* sobre la exocitosis provocada por pulsos despolarizantes de duraciones iguales o menores a 50 mseg (Figura 5.2A). En esta figura se puede observar que la aplicación de BAPTA reduce marcadamente el tamaño de la exocitosis en comparación con EGTA, sobre todo para los pulsos más cortos. El promedio de los  $\Delta C_m$  para pulsos de 50 mseg con BAPTA ( $22 \pm 3$  fF,  $n=14$ ) se redujo significativamente ( $p<0,05$ ) en comparación con los observados en presencia de EGTA ( $32 \pm 1$  fF,  $n=33$ ). Esta diferencia es aún más notoria para pulsos de 20 mseg, donde el  $\Delta C_m$  con BAPTA ( $9 \pm 2$  fF,  $n=6$ ) se redujo en un 62% ( $p<0,05$ )

comparado con el observado con EGTA ( $24 \pm 3$  fF,  $n=9$ ). También se compararon las respuestas exocitóticas en presencia de ambos *buffers* utilizando pulsos pareados para la estimación del tamaño del IRP. Los resultados mostraron que el BAPTA redujo significativamente  $B_{\min}$  y  $B_{\max}$  en comparación con EGTA ( $p<0,001$ ) (Figura 5.2B), mientras que las densidades de las  $\text{ICa}^{2+}$  en ambas condiciones ( $25 \pm 4$  pA/pF con EGTA en comparación con  $21 \pm 4$  pA/pF con BAPTA) no mostraron diferencias significativas.



**Figura 5.2 - Comparación del efecto de EGTA y BAPTA sobre la exocitosis del IRP.** Ambos buffers se agregaron en la solución interna a la misma concentración (0.5 mM) y en experimentos independientes. En (A) se compara la respuesta a pulsos despolarizantes de distintas duraciones, entre 5 y 50 msec, con EGTA ( $n=116$ ) y BAPTA ( $n=53$ ). La respuesta con EGTA sigue un comportamiento exponencial relacionado con el agotamiento del IRP. Las líneas punteadas representan simulaciones de la exocitosis en respuesta a pulsos de distintas duraciones entre 5 y 50 msec (ver simulaciones-Exocitosis del IRP), considerando solamente al IRP (como un pool de vesículas ubicadas a 30 nm) o al IRP sumado al resto del RRP (a 300 nm de los canales de  $\text{Ca}^{2+}$ , como se esquematiza en el inserto). (B) Las barras representan los valores de  $B_{\min}$  y  $B_{\max}$  obtenidos por el protocolo de pulsos pareados para estimar IRP, en células con EGTA o con BAPTA. Los valores de  $B_{\min}$  y  $B_{\max}$  fueron significativamente reducidos en presencia de BAPTA ( $n=13$ ) en comparación a los obtenidos con EGTA ( $n=14$ ) ( $p<0.05$ ).

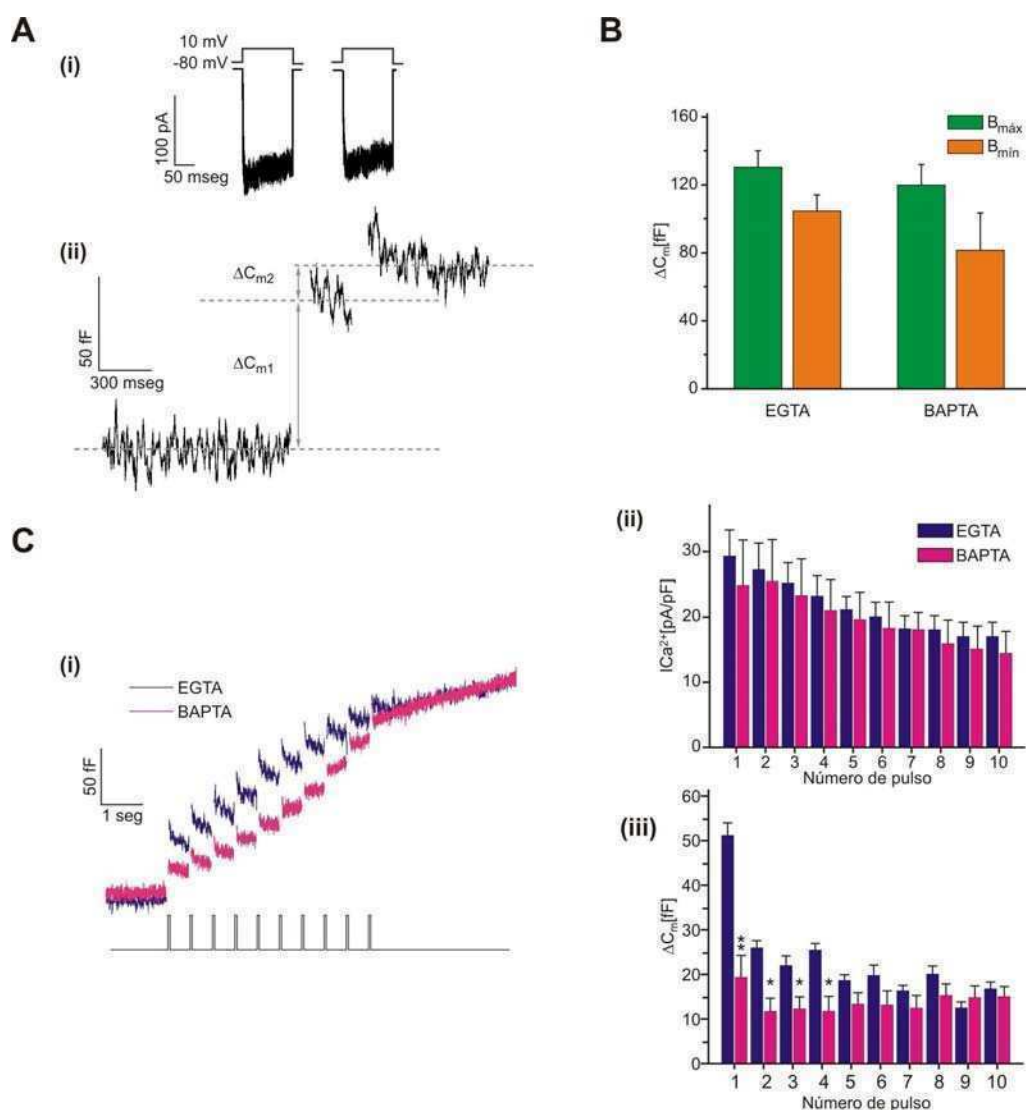
### ***5.1.3 Efecto de BAPTA sobre la exocitosis de las vesículas poco acopladas al estímulo***

A diferencia de lo que ocurre con pulsos breves, se observó que cuando las estimulaciones son largas, e incorporan por lo tanto vesículas distantes a los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  (Voets y col., 1998), los *buffers* EGTA y BAPTA tienen efectos similares sobre la exocitosis (Moser y Neher, 1997a). Para contrastar con lo observado en la sección anterior, probamos el efecto que tienen estos *buffers* sobre la cantidad de vesículas liberadas desde el RRP. Para ello utilizamos el protocolo de pulsos pareados de 100 mseg separados por 300 mseg que fue utilizado por otros grupos para estimar el límite inferior ( $B_{\min}$ ) y superior ( $B_{\max}$ ) de este grupo de vesículas (Voets y col., 1999, Gillis y col., 1996). Trazados representativos de la capacitancia celular y de las  $\text{ICa}^{2+}$  generadas en respuesta a este protocolo se muestran en la figura 5.3A. En promedio, la exocitosis de RRP estimada por  $B_{\max}$  y  $B_{\min}$  no mostró diferencias entre las células cargadas con EGTA o BAPTA (Figura 5.3B), así como tampoco se modificaron las densidades de corrientes ( $23 \pm 5$  pA/pF con EGTA vs.  $19 \pm 3$  pA/pF con BAPTA).

### ***5.1.4 Trenes de despolarizaciones: Componentes altamente y pobremente acoplados***

Como se mostró en una sección anterior, la exocitosis generada por un pulso de 50 mseg puede ser utilizada como estimación del tamaño del IRP. La aplicación de pulsos sucesivos de dicha duración nos permite también observar el reclutamiento de vesículas desde los *pools* que se encuentran río arriba de IRP y/o que se liberan desde sitios más distantes a los canales (Marengo, 2005). La aplicación de este tipo de estímulos, también denominados trenes de despolarizaciones, nos permite diferenciar fases de exocitosis asociadas a vesículas más acopladas y menos acopladas al estímulo (Marengo, 2005). El promedio de los registros de capacitancia celular obtenidos a partir de la estimulación con trenes compuestos por 10 pulsos de 50 mseg con un tiempo entre pulsos de 450 mseg (2 Hz) en células cargadas con EGTA se muestra en la figura 5.3C-i, trazado azul. El análisis del componente sincrónico del tren (Figura 5.3C-iii, barras azules), entendido como los  $\Delta C_m$  que se generan durante cada despolarización (diferencia entre la capacitancia previa a cada pulso y la inmediatamente posterior a terminado el pulso), muestra que a partir del segundo

pulso este componente disminuye a la mitad respecto a lo obtenido para el primer pulso. Dado que es esperable que el primer pulso de 50 mseg libere la mayor parte del IRP, el resultado obtenido se debe probablemente al vaciamiento de ese *pool*. Aun cuando la respuesta sincrónica está disminuida en los pulsos siguientes, en el trazado promedio se observó un aumento sostenido de la capacitancia total (Figura 5.3C-i). El aumento promedio total de la capacitancia generada por la aplicación de los trenes es de  $150 \pm 23$  fF, que correspondería aproximadamente a 115 vesículas (1,3 fF por vesícula).



**Figura 5.3 - Comparación del efecto de EGTA y BAPTA sobre diferentes componentes de la exocitosis.** (A) La estimación del tamaño del RRP se realizó mediante un protocolo de dos pulsos pareados de 100 mseg separados por 300 mseg. En esta figura se muestra un ejemplo de respuesta representativa a este protocolo para las  $ICa^{2+}$  (i), y para la capacitancia celular (ii). Los límites

inferior ( $B_{\min}$ ) y superior ( $B_{\max}$ ) del tamaño del RRP se obtienen a partir de  $\Delta C_m$  para cada pulso ( $\Delta C_{m1}$  y  $\Delta C_{m2}$ ), a partir de las fórmulas detalladas en métodos (sección 4.2.7.1). **(B)** Las barras representan el promedio de los valores límites para el RRP. En este gráfico se compara el efecto de EGTA ( $n=11$ ) contra el buffer rápido BAPTA ( $n=12$ ), ambos dializados a una concentración de 0.5 mM. **(C)(i)** Trazado de cambios de capacitancia celular promedio inducida por un tren de estimulaciones, utilizando como buffer intracelular EGTA ( $n=10$ ) o BAPTA ( $n=9$ ), ambos a una concentración de 0.5 mM. El tren de estimulaciones consta de 10 pulsos de 50 mseg separados por 450 mseg, que se representa alineado debajo del trazado de  $C_m$  **(ii)** En el diagrama de barras se representan las densidades de las  $ICa^{2+}$  promedio de cada uno de los pulsos que componen el tren. Los resultados no mostraron diferencias entre los buffers a lo largo de los 10 pulsos. **(iii)** Las barras representan los  $\Delta C_m$  sincrónicos en función del pulso en ambas condiciones de buffers. Los resultados mostraron una diferencia significativa en los cuatro primeros pulsos ( $p^{**}<0.001$ ,  $p^{*}<0.05$ ) entre las dos condiciones.

El protocolo de estimulación explicado en el párrafo anterior también se aplicó en células en las cuáles se utilizó BAPTA como *buffer* intracelular en reemplazo de EGTA a la misma concentración (0,5 mM). La estimulación provocó un  $\Delta C_m$  similar a los controles con EGTA (Figura 5.3C-i), y la densidad de  $ICa^{2+}$  mostró valores y un perfil de inactivación también similares (Figura 5.3C-ii). Sin embargo, la presencia de BAPTA provocó una disminución clara de la exocitosis durante los primeros pulsos del tren (Figura 5.3C-i). El análisis de la respuesta exocitótica sincrónica mostró una reducción significativa durante los primeros cuatro pulsos ( $p<0,05$ ), pero no se observaron diferencias en los pulsos sucesivos (Figura 5.3C-iii).

### 5.1.5 Discusión

En esta sección se analizaron las características del IRP en células cromafines de ratón en cultivo. El IRP se evidenció como un proceso exocitótico rápido que se satura con pulsos despolarizantes de aproximadamente 50 mseg, estimándose un valor asintótico de  $33 \pm 1$  fF. A su vez, a partir del protocolo de pulsos pareados (Moser y Neher, 1997a; Álvarez y col., 2008) se obtuvieron valores para IRP entre  $32 \pm 3$  fF y  $41 \pm 3$  fF. Las estimaciones del IRP obtenidas por ambos métodos son similares, y corresponden a un número entre 24-34 vesículas, suponiendo que cada vesícula aporta con 1,3 fF (Moser y Neher, 1997b). Los valores medidos del tamaño del IRP suelen variar dependiendo de los distintos preparados

de células cromafines. En rodajas de glándula adrenal de ratón se estimó un IRP de 35 vesículas (Voets y col., 1999), 17 vesículas en células de rata en cultivo (Horrigan y Bookman, 1994) y 14 vesículas en células bovinas en cultivo (Gillis y col., 1996). La tasa de exocitosis que obtuvimos a partir de nuestros resultados en células de ratón, medida a través del ajuste exponencial de la exocitosis en respuesta a pulsos  $\leq 50$  mseg, fue de  $64 \text{ seg}^{-1}$ . Este valor es mayor a los observados en células de rata y vaca en cultivo ( $20 \text{ seg}^{-1}$ ) (Horrigan y Brookman, 1994; Marengo, 2005) pero menor al obtenido en rebanadas ( $150 \text{ seg}^{-1}$ ) (Voets y col., 1999; Moser y Neher, 1997a). Estas diferencias en tamaño de IRP y tasa de liberación se deberían en parte a que las células en condiciones fisiológicas mantendrían un mayor acople entre las fuentes de  $\text{Ca}^{2+}$  y las vesículas liberables, lo cual se perdería parcialmente en el cultivo (Moser y Neher, 1997a). Sin embargo es de notar que tanto la tasa de liberación como el tamaño de IRP determinados por nosotros se ubicaron debajo de los valores obtenidos en rebanadas, pero bien por arriba de los registrados en células bovinas y de rata.

Por otro lado, el tamaño estimado del total de RRP (que incluye a IRP) medido por el protocolo de pulsos pareados, se ubicó entre cotas de  $98 \pm 15 \text{ fF}$  y  $140 \pm 17 \text{ fF}$ , que corresponde a un número de vesículas entre 75 y 107. Este valor es inferior a resultados obtenidos por otros autores con el mismo protocolo pero en rodajas de médula adrenal de ratón, en los cuales el RRP fue acotado entre 120 y 150 vesículas (Voets y col., 1999), y a su vez inferior a las estimaciones obtenidas en experimentos que combinan la técnica de liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  por *flash photolysis* del  $\text{Ca}^{2+}$  enjaulado y las mediciones de capacitancia que fueron entre 125 -140 vesículas (Voets y col. 1999; Ashery y col., 2000).

La respuesta exocitótica a una sucesión de estímulos despolarizantes en un tren de 10 pulsos aplicados a una frecuencia de 2 Hz evidenció la diferencia de acoplamiento con el estímulo que existe entre el IRP y el resto de las vesículas del RRP. Este tipo de resultado es similar a lo informado en la literatura (Augustine y Neher, 1992; Marengo, 2005). El primer pulso activaría la fusión del IRP, mientras que los pulsos siguientes, gracias a un proceso de suma temporal, lograrían generar un aumento de calcio a mayor distancia de los canales, con lo cual se secretarían vesículas más distantes (Voets y col., 1999; Marengo, 2005). El  $\Delta C_m$  alcanzado después de 10 despolarizaciones fue en promedio de  $150 \pm 23 \text{ fF}$ , que correspondería aproximadamente a 115 vesículas. Este protocolo liberó un número ligeramente superior de vesículas en comparación a las estimaciones realizadas en esta tesis por medio del protocolo de pulsos pareados para el RRP. Es posible, que esta

diferencia se deba a que con este estímulo, que dura varios segundos, se puedan movilizar también vesículas del SRP.

Los resultados experimentales muestran una diferencia de sensibilidad entre las vesículas del IRP y el resto del RRP al *buffer* rápido BAPTA. El *buffer* rápido BAPTA ha sido ampliamente utilizado para estudiar el nivel de acoplamiento espacial entre las fuentes de  $\text{Ca}^{2+}$  y las vesículas (Kits y col., 1999; Neher, 1998; Meinrenken y col., 2002). Si las vesículas se ubican a distancias cercanas a los canales, un *buffer* lento como EGTA no debería afectar la liberación simplemente porque no es lo suficientemente rápido para interceptar al  $\text{Ca}^{2+}$  antes de que llegue al sensor en la vesícula (Neher, 1998). Mientras que la situación es distinta cuando un *buffer* rápido como BAPTA, que tiene una constante de afinidad ( $k_{on}$ ) 100 veces mayor que EGTA, es introducido. En ese caso BAPTA se pega al calcio antes que llegue a la vesícula y por lo tanto reduce la liberación de un componte secretorio altamente acoplado. Por otro lado, frente a despolarizaciones prolongadas que generan entradas de calcio sostenidas, es esperable que la reacción de unión del BAPTA con el  $\text{Ca}^{2+}$  tienda al equilibrio. En el equilibrio, como el EGTA y BAPTA tienen constantes de afinidad ( $K_d$ ) similares (0,1 – 0,2  $\mu\text{M}$ ), sus efectos se asemejarán. Coherentemente con esto, efectos similares entre BAPTA y EGTA se observaron cuando se aplicaron despolarizaciones prolongadas o trenes (al final de los mismos), los cuales son capaces de liberar no solo las vesículas del IRP sino que también prácticamente todas las del RRP. La distancia efectiva entre los canales y las vesículas a la cual el *buffer* BAPTA afecta la liberación se estimó en aproximadamente 30 nm y a partir de una distancia mayor a 200 nm los *buffers* tendrían efectos similares (Neher, 1998A). Por lo tanto los resultados obtenidos en esta sección soportan la existencia de una alta colocación entre los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  y las vesículas del IRP, y una acople pobre con el resto vesículas que conforman el RRP.

Teniendo en cuenta las evidencias obtenidas en esta sección se propone un modelo (ver sección A.2.1 y sección 4.6) en el cual las vesículas del IRP, que corresponden a un 27% del RRP (según nuestros resultados), se encontrarían ubicadas en sitios cercanos a los canales de calcio (30 nm), a diferencia de las demás vesículas del RRP que se encontrarían a 300 nm (Segura y col., 2000 y Klingauf y Neher, 1998). Una simulación suponiendo estas distancias reproduce la curva experimental de manera muy satisfactoria (ver figura 5.2A, línea punteada color naranja). Cuando las simulaciones se realizaron considerando solamente las vesículas del IRP se obtuvo un resultado muy similar (ver figura 5.2A línea punteada color verde). La similitud entre estas dos simulaciones sugiere que las vesículas menos acopladas del RRP (que no forman parte de IRP) tendrían poca participación frente a



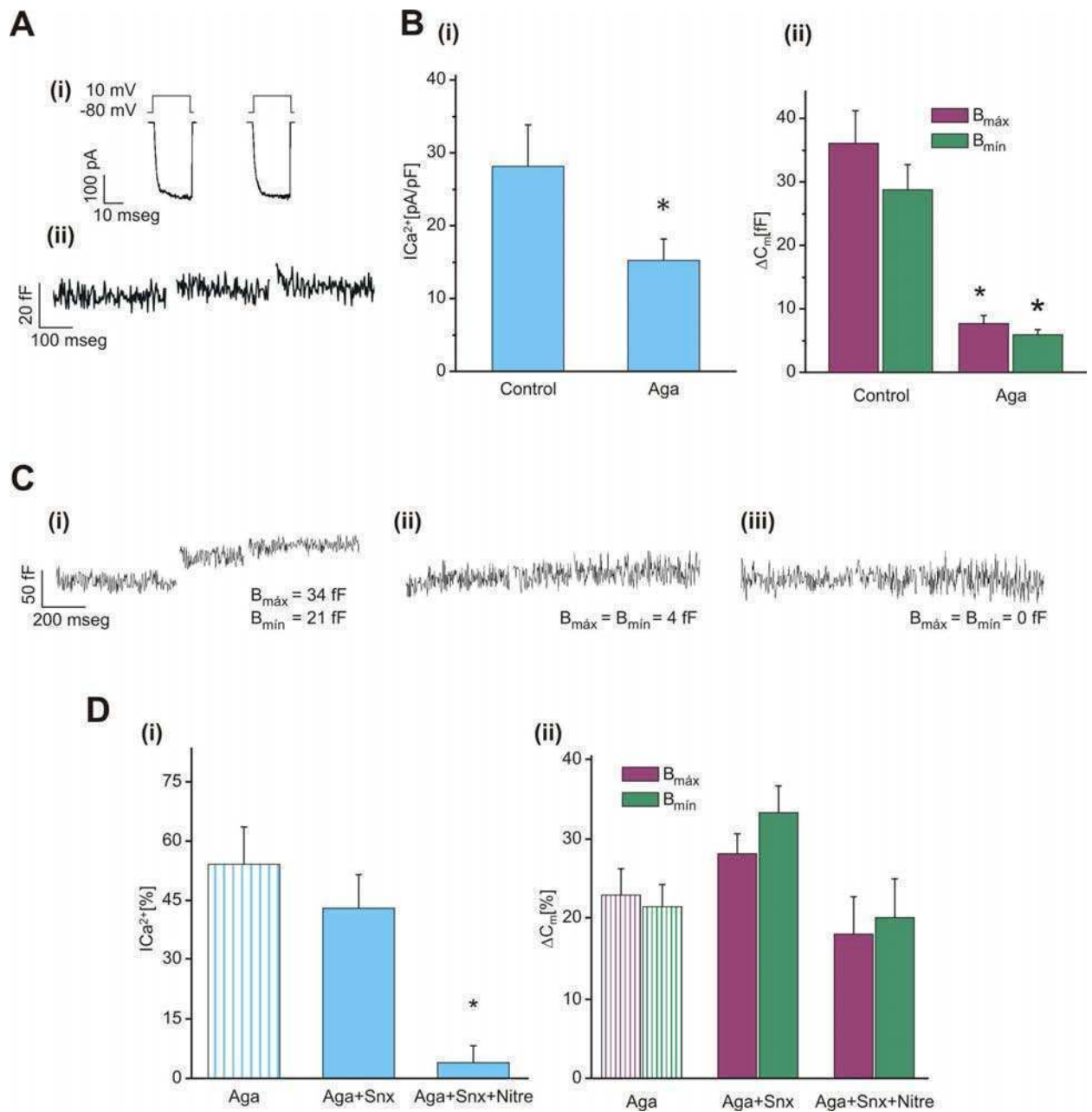
pulsos de duraciones menores a 50 mseg Para poder simular satisfactoriamente la exocitosis obtenida experimentalmente, se debió ajustar el valor de la  $ICa^{2+}$  (que entra desde una fuente puntual por cada  $\mu m^2$  de membrana) a un valor de 0,3 pA (ver sección A.2.1). Por otro lado, la corriente de canal único en células cromafines se estimó por análisis de ruido en 50 fA (Fenwick y col., 1982; Klingauf y Neher, 1997). La comparación entre el valor de corriente de canal único y el valor ajustado en la simulación implicaría que un *cluster* de 6 canales sería el responsable de la liberación del IRP. La existencia de *clusters* acoplados a la liberación del IRP es consistente con otros resultados obtenidos a través de simulaciones probabilísticas del tipo Monte Carlo (Gil y col., 2000; Segura y col., 2000). Según estos autores la corriente necesaria para liberar la fase rápida (asociada al IRP) de la respuesta bifásica observada en células cromafines frente a un tren de despolarizaciones, es compatible con la entrada de calcio por un *cluster* de 4 canales (Segura y col., 2000).

## 5.2 Canales de calcio asociados al IRP

Las evidencias experimentales obtenidas para la tesis de licenciatura de la autora de esta tesis doctoral mostraron que las vesículas del IRP están específicamente acopladas a canales de  $Ca^{2+}$  de tipo P/Q (ver capítulo 2). Este resultado fue reevaluado en esta tesis con la utilización del bloqueante específico del canal P/Q,  $\omega$ -agatoxina IVA (Aga) a una concentración de 200 nM. Primero se repitieron los experimentos en los que se analizó el efecto de la toxina sobre la exocitosis inducida por el protocolo de pulsos pareados para estimar el IRP. En la figura 5.4A se muestra un ejemplo representativo de la respuesta en presencia del bloqueante. El tratamiento produjo una reducción moderada pero significativa en la densidad de  $ICa^{2+}$  ( $p < 0,05$ ) (Figura 5.4B-i), y una reducción muy marcada de la exocitosis de vesículas provenientes del IRP ( $p < 0,001$ ) respecto a la condición control (Figura 5.4B-ii), confirmando el resultado obtenido anteriormente (ver figura 2.1).

En los resultados previos se observó que además de la muy importante contribución de los canales P/Q a la exocitosis de IRP, existiría una cierta participación de la  $ICa^{2+}$  de tipo R en la exocitosis de dicho *pool*. Dicha conclusión provino de la inhibición significativa de la liberación del IRP por la aplicación del bloqueante del canal R, SNX-486 (Snx) (ver figura 2.1). Sin embargo se han detectado efectos cruzados de esta droga sobre canales P/Q (Arroyo y col., 2003), sugiriendo la posibilidad de que en nuestros experimentos previos (donde los bloqueantes se aplicaron de manera independiente) hubiésemos observado en realidad las consecuencias de un bloqueo parcial de los canales P/Q. Para analizar más

cuidadosamente esta posibilidad se estudió si la aplicación conjunta de Snx+Aga mostraba un efecto aditivo o no entre ambos bloqueantes. Por otro lado, también quisimos confirmar la aparente falta total de efecto de los canales L sobre la exocitosis de IRP. Por lo tanto se aplicaron en forma secuencial en cada experimento, luego de obtener un registro en condiciones control, primero Aga (200 nM) + Snx (1  $\mu$ M) y finalmente Nitrendipina (Nitre) (10  $\mu$ M) para bloquear los canales L. Un ejemplo representativo de la respuesta en estos experimentos se muestra en la figura 5.4C. En promedio, se observó que al agregar Snx+Aga la exocitosis disminuyó a un 30% y la densidad de corriente a un 40%, mientras que el agregado de Nitre eliminó totalmente las corrientes (Figura 5.4D-i y 5.4D-ii) sin afectar el IRP, quedando una fracción remanente de aproximadamente 5 fF (Figura 5.4D-ii). Estos resultados muestran que la inhibición de la exocitosis con Snx+Aga no se diferencia de lo obtenido previamente con Aga sola (ver comparación de porcentajes de inhibición en figura 5D-ii). Además confirman que el bloqueo de los canales L, si bien tiene un importante efecto sobre las corrientes no es capaz de reducir adicionalmente al IRP por debajo de lo obtenido con Aga o con Aga+Snx. Estos resultados por lo tanto, refuerzan el concepto de que son los canales P/Q los principales responsables de la exocitosis de IRP.

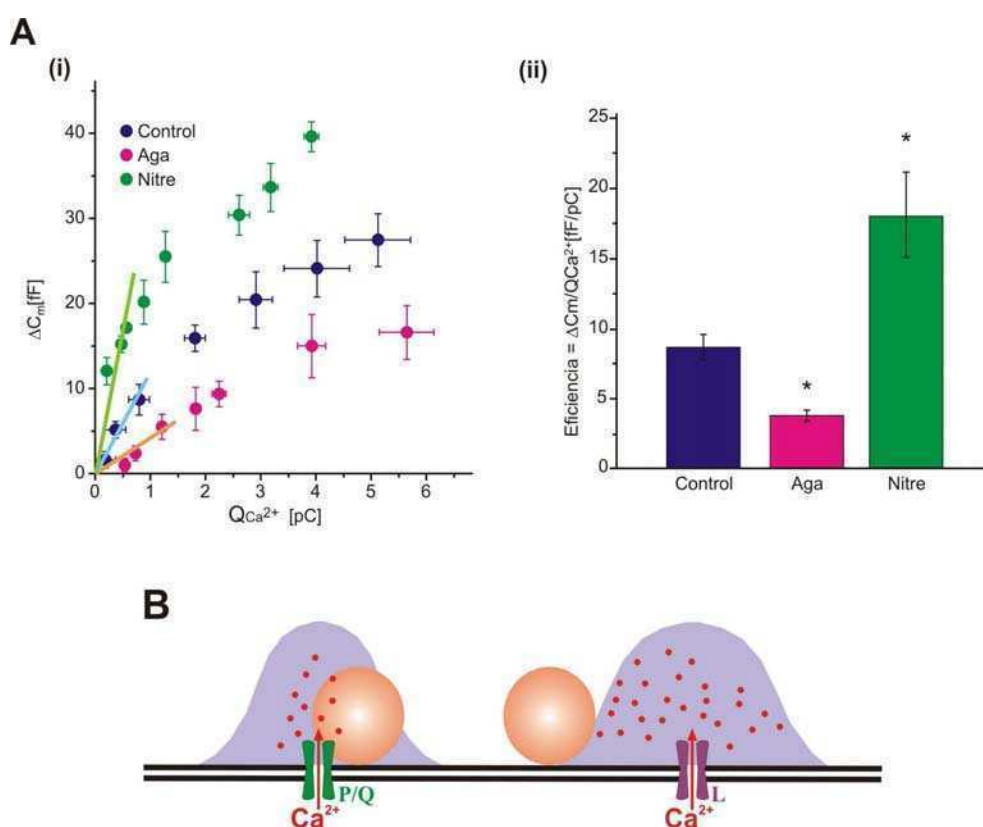


**Figura 5.4** - Participación de los subtipos de canales de calcio en las corrientes y la exocitosis del IRP. (A) En la figura se muestra un ejemplo del efecto del bloqueante del canal P/Q,  $\omega$ -agatoxina-IVA a 200 nM (Aga) sobre (i) las  $ICa^{2+}$  y (ii) el trazado de capacitancia en respuesta al protocolo de pulsos pareados que permiten la cuantificación del IRP (B) Los diagramas de barras representan el promedio de (i) las densidades de  $ICa^{2+}$  y de (ii) los valores de  $B_{max}$  y  $B_{min}$  en condición control y con el agregado de Aga. Los resultados muestran que el bloqueante ( $n=8$ ) tuvo un efecto inhibitorio significativo ( $p<0.05$ ) sobre las densidades de corrientes cuando se lo comparó con experimentos realizados en condiciones controles ( $n=6$ ), y generó una inhibición mucho más importante en la

exocitosis de IRP ( $p < 0.001$ ). (C) En esta figura se muestra un ejemplo representativo de un experimento en el que se evaluó la exocitosis, provocada por el protocolo de pulsos pareados en presencia de los distintos bloqueantes de canales. El experimento consistió en medir el IRP en (i) condiciones control, (ii) en presencia de Aga+Snx y finalmente con (iii) Aga+Snx+Nitre. (D) En estos diagramas de barras se muestran los valores medios de las corrientes (i); y para las cotas máxima y mínima del IRP (ii) obtenidos en estos experimentos, expresados como porcentaje del control. Para su comparación se incluye en dicho diagrama el porcentaje de inhibición obtenido en los experimentos en los que se utilizó solamente Aga como bloqueante (barras rayadas).

Es esperable que la aplicación de los bloqueantes de los subtipos de canales de  $\text{Ca}^{2+}$  produzca una reducción relativa en la  $\text{ICa}^{2+}$  equivalente a la proporción en la que cada subtipo de canal participe en la  $\text{ICa}^{2+}$  total en condiciones control. En presencia del bloqueante del canal P/Q, Aga y del bloqueante del canal L, Nitro, las densidades de  $\text{ICa}^{2+}$  muestran una reducción del 44% y del 56% respectivamente con respecto al control (ver figura 2.1). Por otro lado, los experimentos descritos anteriormente (Figura 5.4D) sugieren que el efecto observado para Snx se debería fundamentalmente a un bloqueo parcial de los canales P/Q. Por lo tanto parecería que prácticamente la totalidad de las  $\text{ICa}^{2+}$  estarían formadas por estos dos subtipos de canales. Sin embargo, poder interpretar cómo una reducción de la  $\text{ICa}^{2+}$  afecta a la exocitosis no es tan sencillo. Dado que la dependencia de la exocitosis con la corriente no es lineal, una reducción modesta en la  $\text{ICa}^{2+}$  podría generar un efecto más notable en la exocitosis. Para tratar de solucionar esta dificultad se comparó, en lugar de la exocitosis directamente, la eficiencia en la liberación entre las toxinas, la cual se definió como la relación entre exocitosis y la integral de  $\text{ICa}^{2+}$  ( $\text{QCa}^{2+}$ ). Para cada condición (Control, Aga y Nitro) los experimentos en los que se midieron  $\Delta\text{C}_m$  provocados por pulsos despolarizantes de distintas duraciones, entre 5 y 50 mseg, fueron ordenados en función de la  $\text{QCa}^{2+}$  y promediados en grupos de forma de tener en cada promedio un número similar de experimentos. Se utilizaron mediciones resultantes de pulsos  $\leq 50$  mseg para enfocarnos solamente en la exocitosis de vesículas pertenecientes a IRP. Los resultados obtenidos por este análisis se muestran en función de la  $\text{QCa}^{2+}$  en la figura 5.5A-i. En los tres casos, los  $\Delta\text{C}_m$  en función de las  $\text{QCa}^{2+}$  mostraron una dependencia exponencial. La aplicación de Aga redujo la amplitud de la exocitosis en todo el rango de  $\text{QCa}^{2+}$ , mientras que Nitro produjo el efecto opuesto, aumentando la amplitud en todo el rango. En la condición control la respuesta muestra un comportamiento intermedio entre los dos tratamientos. Estos resultados se pueden interpretar por las diferencias en la cantidad de calcio necesaria para producir la exocitosis de un determinado número de vesículas dependiendo del acople entre

los canales y las vesículas en cada condición. Esta hipótesis se esquematiza en la figura 5.5B. En este dibujo el grado de acople de las vesículas (círculos naranjas) se representa por la distancia a los canales de  $\text{Ca}^{2+}$ , y la cantidad de  $\text{Ca}^{2+}$  necesaria para generar la liberación de estas vesículas por la extensión de la señal de  $\text{Ca}^{2+}$  (puntos rojos). Al bloquear el canal L, la exocitosis se produciría solamente por la corriente que ingresa por los canales P/Q, y debido al alto acople que tendrían estos canales con las vesículas del IRP, la cantidad de calcio entrante necesaria para generar una dada exocitosis debería ser menor. Contrariamente, al bloquear los canales P/Q, la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  necesaria para generar una exocitosis equivalente será mucho mayor, ya que dicha entrada se produce por los canales L, más distantes de las vesículas. Consistentemente con esta interpretación, la integral de corriente necesaria para generar un  $\Delta C_m$ , que corresponde aproximadamente a la mitad del IRP (16 fF), fue de 1,9 pC en controles, de 0,7 pC con Nitro, y de 5,6 pC en presencia de Aga. La relación  $5,6 / 0,7 = 8$  da una idea aproximada de la diferencia en eficiencia existente entre canales P/Q y L. Otra forma en que se evaluaron las eficiencias para la liberación de vesículas entre canales P/Q y L fue a través de las pendientes iniciales de las curvas de la figura 5.5A -i, para lo cual se realizaron ajustes lineales para los primeros 3 puntos de cada curva. Los valores obtenidos para dichas pendientes fueron  $9,4 \pm 0,7$  fF/pC en la curva control,  $26 \pm 3$  fF/pC para Nitro y  $4,2 \pm 0,6$  fF/pC para Aga, donde puede notarse nuevamente como los canales P/Q resultan marcadamente más eficientes que los L. Finalmente, el promedio de la eficiencia de la liberación en toda la curva, calculadas como los  $\Delta C_m$  sobre la  $Q\text{Ca}^{2+}$  para todos los valores medidos de integrales, es significativamente reducida con Aga ( $p < 0,05$ ) y aumentada con Nitro ( $p < 0,05$ ) en comparación con la obtenida en células controles (Figura 5.5A-ii).



**Figura. 5.5** - Diferencias en las eficiencias para generar exocitosis entre los canales P/Q y L. **(A)** (i) Los  $\Delta C_m$  en función de  $QCa^{2+}$  provocadas por pulsos despolarizantes de duraciones entre 5 y 50 msec en condiciones Control, en presencia de Aga (200nm) y de Nitre (10 $\mu$ m). En cada condición, de un número total de experimentos independientes (n) se formaron grupos de número parecidos de experimentos (N). Los promedios de cada grupo con su error estándar tanto en la  $QCa^{2+}$  como en el  $\Delta C_m$  son los que se representan como círculos llenos en la figura. En controles n= 130 y N= 16-20, con Aga n=45 y N=5-7 y por último con Nitre n=45 y N=5-7. En líneas llenas continuas superpuestas a los valores experimentales se representan los ajustes lineales, con ordenada al origen igual a cero, que se realizaron tomando los tres primeros pulsos de cada curva (ver valores en el texto). (ii) El diagrama de barras representa el valor promedio de la eficiencia de liberación obtenida para cada una de las tres condiciones experimentales, como la relación entre la exocitosis y la  $QCa^{2+}$  para todos los valores de  $QCa^{2+}$  medidos. Mientras que Aga reduce la eficiencia significativamente ( $p < 0,05$ ), Nitre la aumenta significativamente ( $p < 0,05$ ) respecto a los controles. **(B)** En el esquema se esquematiza la diferencia en el acople de los subtipos de canales con la liberación del IRP. Las vesículas liberables (círculos naranjas) se encontrarían altamente acopladas al canal P/Q y pobremente acopladas al L.

### 5.2.1 Discusión

El IRP, se definió como un *pool* compuesto por vesículas que se ubican en la proximidad de los canales de calcio. Frente a esto, a su vez se plantean dos posibilidades. Una posibilidad es que esta proximidad se debiera a una distribución al azar de vesículas alrededor de los canales. Esta hipótesis fue seriamente cuestionada a partir de simulaciones computacionales (Klingauf y Neher, 1998; Segura y col., 2000), las cuales demostraron que una distribución al azar de vesículas y de canales no explica la respuesta bifásica que se observa en respuesta a un tren de despolarizaciones (Horrigan y Bookman 1994; marengo, 2005). La otra alternativa sería la existencia de una cierta interacción específica entre un tipo de canal particular y las vesículas. Esta situación implica que la secreción del IRP este preferencialmente acoplada con un tipo de canal particular de  $\text{Ca}^{2+}$ . Esta posibilidad fue estudiada en la tesis de licenciatura de la autora de esta tesis doctoral, y se concluyó que las vesículas del IRP se acoplan preferentemente a los canales P/Q (ver capítulo 2). En esta sección de resultados se sumaron nuevas evidencias experimentales a esta hipótesis. Los resultados experimentales mostraron, a las claras, una marcadamente mayor eficiencia de liberación vesicular para los canales P/Q que para los L. Los resultados por otro lado muestran una prácticamente total falta de participación de los canales L en la liberación de IRP: en primer lugar el bloqueo solitario de estos canales no afectó significativamente la exocitosis de IRP (ver figura 2.1); y en segundo lugar la aplicación de Nitro no logró reducir adicionalmente al IRP por debajo de lo obtenido con Aga o con Aga+Snx (ver figura 5.4D en la sección 5.2).

Se analizó también la posible participación de los canales de tipo R en la liberación de IRP (ver figura 2.1). Nuestros resultados están de acuerdo con las observaciones de Arroyo y col. (2003), donde demostró que  $0,3 \mu\text{M}$  Snx bloqueaba a los canales de calcio tipo P/Q. Dado que Snx+Aga no genera un grado de inhibición de la exocitosis de IRP que supere al obtenido con Aga solo, ni tampoco provoca un mayor bloqueo de la  $\text{ICa}^{2+}$ , creemos que al menos una parte importante del efecto obtenido de Snx sobre IRP probablemente se deba a una acción sobre los canales P/Q.

Nuestra hipótesis, que plantea que los canales P/Q son los responsables fundamentales de la existencia de IRP, es apoyada también por evidencias obtenidas por otros investigadores, los cuales observaron un alto acoplamiento del canal P/Q con la exocitosis. Primero, Aga inhibió más eficientemente la exocitosis en células cromafines bovinas cuando la concentración extracelular de  $\text{Ca}^{2+}$  era baja ( $0,5 \text{ mM}$ ), en comparación con una

concentración alta (5 mM) (Lara y col., 1998). A concentraciones bajas de  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular se supone que se favorece la formación de una señal de calcio más restringida alrededor de los canales, que inducirá la liberación de solamente las vesículas más cercanas. Por lo tanto la inhibición de un canal altamente acoplado a la exocitosis se evidenciará mejor bajo dicha condición. Por otro lado, se observó en rebanadas de la glándula adrenal de ratón que la exocitosis en respuesta a PAs era altamente sensible a la aplicación de Aga (Chan y col., 2005).

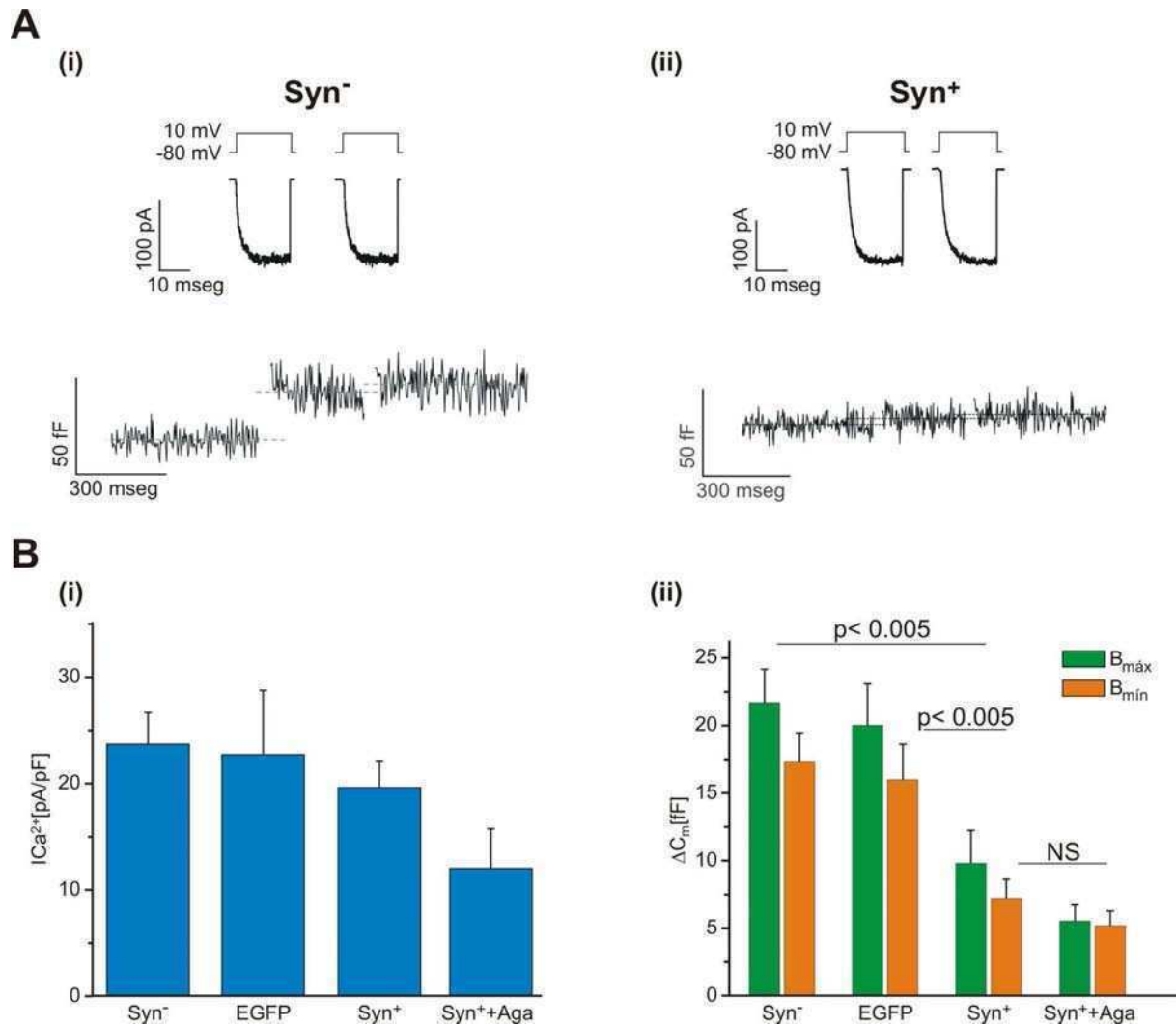
### ***5.3 Mecanismo de acople entre los canales P/Q y las vesículas del IRP***

En esta sección, nos propusimos estudiar la posibilidad de que el acople funcional entre las vesículas del IRP y los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  tipo P/Q se genere a través del sitio de interacción *synprint*. Se ha demostrado en neuronas que la secuencia aminoacídica intracelular *synprint* de la subunidad  $\alpha_1$  del canal P/Q y del canal N interaccionan con las proteínas de la maquinaria exocitótica (Catterall, 1999). Esta interacción contribuye a la co-localización espacial de las vesículas sinápticas con esos canales, de manera tal de aumentar la eficiencia en la liberación (Mochida, 1996; Zu-Cuelgue Sheng y col., 1998; Mochida y col., 2003). Esta posibilidad fue estudiada transfectando nuestras células cromafines con un plásmido pIRES2-EGFP que contiene la secuencia del péptido del *synprint* (ver sección 4.1.3). Las células positivamente transfectadas pueden ser identificadas por la fluorescencia asociada a EGFP (*Enhance Green Fluorescent Protein*). Se espera que el agregado exógeno del péptido *synprint* compita con la secuencia endógena de éste en el canal, produciendo el desacople de la interacción vesícula-canal.

#### ***5.3.1 Exocitosis del IRP en células transfectadas con synprint***

En cada cultivo, las células transfectadas que expresaron las proteínas ( $\text{Syn}^+$ ) fueron identificadas por la fluorescencia asociada a EGFP (ver sección 4.1.3). Los valores de las  $\text{ICa}^{2+}$  y de la exocitosis medidas en células  $\text{Syn}^+$  fueron comparados con dos condiciones controles: células no fluorescentes ( $\text{Syn}^-$ ) que compartieron el mismo tratamiento de transfección que las células  $\text{Syn}^+$ , y células transfectadas con un plásmido idéntico pIRES2-EGFP pero sin la secuencia *synprint*, obtenidas de cultivos independientes.



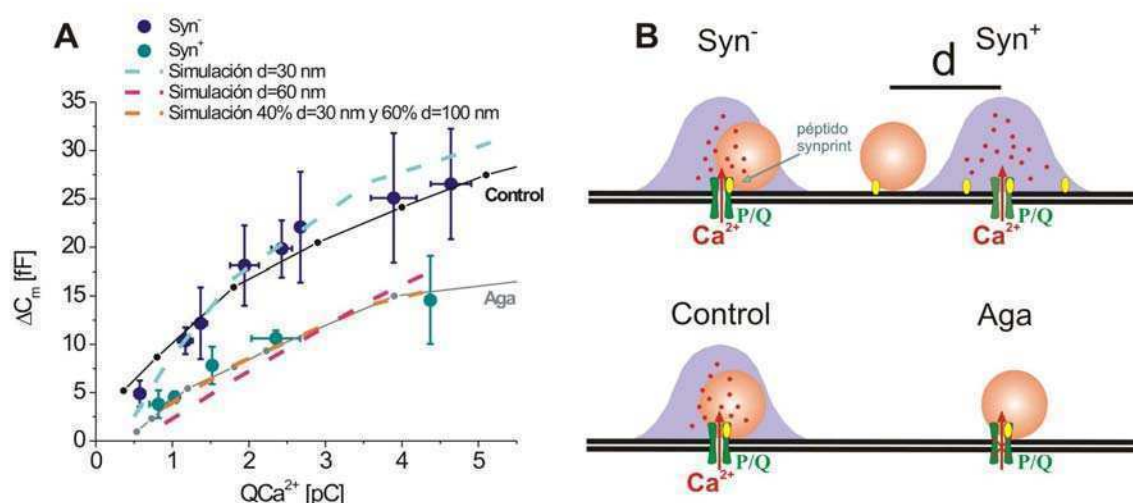


**Figura 5.6** - Efecto de péptido synprint exógeno sobre la liberación del IRP. (A) Ejemplos de los trazados de capacitancia y las  $ICa^{2+}$  frente al protocolo de pulsos pareados en (i) Syn<sup>-</sup> y (ii) Syn<sup>+</sup>. (B) Comparación del efecto del synprint entre los controles (células transfectadas con EGFP (EGFP,  $n=7$ ), células no transfectadas (Syn<sup>-</sup>,  $n=30$ )) y las células transfectadas con synprint /EGFP (Syn<sup>+</sup>,  $n=14$ ), y transfectadas con synprint/EGFP con agregado de 200 nM de Aga (Syn<sup>+</sup> + Aga,  $n=7$ ). (i) Las barras, que representan las densidades de corrientes en todas estas condiciones, no muestran diferencias entre sí la aplicación de Aga redujo la densidad de corriente en un 35%, aunque esta diferencia no llegó a ser estadísticamente significativa ( $p < 0,1$ ). (ii) En este diagrama de barras se representa los valores de  $B_{max}$  y  $B_{min}$ . La inhibición del IRP es significativa en Syn<sup>+</sup> y en Syn<sup>+</sup>+Aga ( $p < 0,005$ ) con respecto a ambos controles, mientras que no se hallaron diferencias ni entre los controles, ni entre Syn<sup>+</sup> y Syn<sup>+</sup>+Aga.

El tamaño del IRP fue medido en células  $\text{Syn}^+$ ,  $\text{Syn}^-$  y EGFP utilizando el protocolo de pulsos pareados descrito anteriormente. En la figura 5.6A se muestran ejemplos de trazados representativos de capacitancia y  $\text{ICa}^{2+}$  obtenidos en respuesta a este protocolo para condiciones  $\text{Syn}^+$  y  $\text{Syn}^-$ . Comparando estos ejemplos se puede observar que frente a  $\text{ICa}^{2+}$  similares hay una importante inhibición en la exocitosis del IRP en el  $\text{Syn}^+$  en comparación con el  $\text{Syn}^-$ . En promedio, la densidad de las  $\text{ICa}^{2+}$  no difirieron significativamente entre las dos condiciones controles ( $\text{Syn}^-$  y EGFP), como tampoco entre dichos controles y a las células  $\text{Syn}^+$  (Figura 5.6B-i). Sin embargo, en cuanto a los  $\Delta C_m$  de estos experimentos, se puede observar que las células  $\text{Syn}^+$  presentaron un tamaño de IRP marcadamente más pequeño con respecto a ambas condiciones control (Figura 5.6B-ii), ( $p < 0,005$ ). Estos datos sugieren que el acople funcional entre los canales P/Q y las vesículas del IRP es interferido por la expresión del péptido *synprint* libre exógeno, lo que en consecuencia inhibiría la liberación del IRP. En coherencia con esta interpretación, el uso del bloqueante específico del canal P/Q Aga en las células  $\text{Syn}^+$  ( $\text{Syn}^+ + \text{Aga}$ ) no modificó la exocitosis residual del IRP medida en las células de  $\text{Syn}^+$  (Figura 5.6B-ii).

También analizamos el efecto de la transfección del péptido *synprint* sobre la eficiencia de la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  para inducir la exocitosis del IRP. Los  $\Delta C_m$  provocados por pulsos despolarizantes con duraciones entre 5 y 50 mseg fueron agrupados de la misma forma que en la figura 5.5A-i y graficados en función de la  $\text{QCa}^{2+}$  para células  $\text{Syn}^+$  y  $\text{Syn}^-$  (Figura 5.7A). En estas condiciones experimentales, la exocitosis fue claramente reducida en las células  $\text{Syn}^+$  respecto a los valores obtenidos para  $\text{Syn}^-$  en todo el rango medido. La eficiencia promedio de toda la curva en cada condición, resultó ser de  $8,0 \pm 0,5 \text{ fF/pC}$  para  $\text{Syn}^-$  y  $4,4 \pm 0,2 \text{ fF/pC}$  para  $\text{Syn}^+$  ( $p < 0,001$ ). Además, el comportamiento observado para  $\text{Syn}^-$  y  $\text{Syn}^+$  fue similar al observado en células Control (línea negra continua) y con Aga (línea gris continua) respectivamente, como se puede observar en la figura 5.7A. Estos resultados indican que el bloqueo de los canales P/Q o la interferencia de la interacción canal-vesícula producen efectos similares sobre exocitosis del IRP. En el gráfico de la figura 5.7B se intentó representar esta hipótesis. Mientras que Aga bloquea la fuente de  $\text{Ca}^{2+}$  asociada al IRP, el agregado del péptido *synprint* produciría un desacoplamiento entre las vesículas y los canales de este *pool* vesicular (Figura 5.7B). Las vesículas, una vez desacopladas por el *synprint* se ubicarían a distancias mayores respecto de los canales disminuyendo su probabilidad de liberación (Figura 5.7B). Para estimar la distancia promedio a la cual se ubicarían estas vesículas respecto de los canales se generaron simulaciones ubicando las vesículas del IRP a distintas distancias del canal ( $d$ ) (ver sección A.2.2). La condición control es ajustada satisfactoriamente por una simulación en la que las vesículas se ubican a 30 nm

del canal ( $\text{Syn}^-$ ), mientras que una distancia de 60 nm del canal es la que mejor reproduce los valores experimentales del  $\text{Syn}^+$  (Figura 5.7 A). Es posible que el agregado de *synprint* no llegue a desacoplar el total de las vesículas del IRP, más aun en la figura 5.6B-ii se observa un remanente  $\sim 8$  fF en las células  $\text{Syn}^+$ . Este remanente representa el 40 % del valor control. Una simulación dejando un 40% fijo en la posición a 30 nm y llevando al resto de las vesículas a 100 nm se aproxima mucho mejor al comportamiento de los valores experimentales (Figura 5.7A).

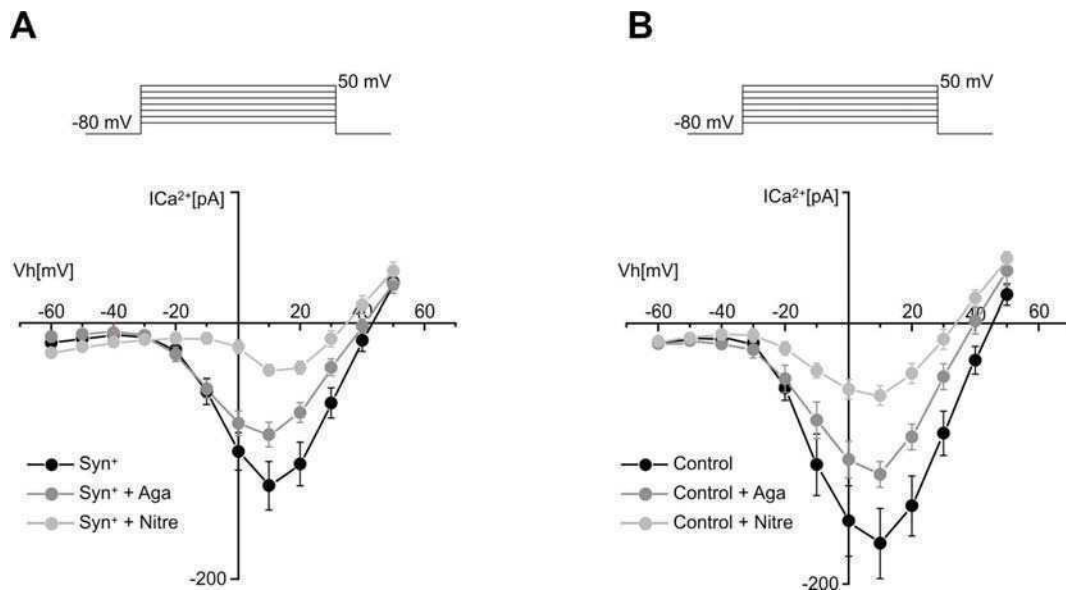


**Figura 5.7** - Efecto del *synprint* sobre la exocitosis generada por pulsos despolarizantes de corta duración (A) Cambios de  $C_m$  en función de la  $QCa^{2+}$  para células  $\text{Syn}^+$  y  $\text{Syn}^-$ . En cada condición, de un número total de experimentos obtenidos para despolarizaciones de duraciones  $\leq 50$  msec ( $n$ ) se formaron grupos de número ( $N$ ) parecidos de experimentos. Los promedios de cada grupo con su error estándar tanto en la integral como en el  $\Delta C_m$  son los que se representan como círculos llenos en la figura. En  $\text{Syn}^-$   $n=40$  y  $N=4-7$  y en  $\text{Syn}^+$   $n=20$  y  $N=3-5$ . Las líneas sólidas conectan los valores experimentales obtenidos en condiciones control (negro) y en presencia de Aga (gris) para los experimentos representados en la figura 5.5A. Las líneas punteadas representan el resultado de simulaciones de la exocitosis de las vesículas del IRP, variando la distancia ( $d$ ) de estas vesículas al canal para evaluar el efecto del *synprint* sobre el IRP. Tomando una distancia única de 30 nm (línea punteada celeste) y una de 60 nm (línea punteada rosa) se obtiene una buena reproducción de los valores de  $\text{Syn}^-$  y  $\text{Syn}^+$  respectivamente. Sin embargo una mejor reproducción de los valores para  $\text{Syn}^+$  se observa cuando se supone que el 40% de las vesículas están ubicadas a 30 nm y el resto a 100 nm (línea punteada naranja). (B) El esquema representa el efecto hipotético que la transfección y la aplicación del bloqueante del canal P/Q generan sobre la exocitosis de las vesículas altamente

acopladas del IRP. El péptido exógeno (óvalos amarillos) desplazaría por competencia las vesículas del IRP a una distancia  $d$  del canal. Mientras que Aga bloquea la entrada de calcio por el canal P/Q.

### 5.3.2 Efecto de la transfección con *synprint* sobre las corrientes de calcio

Además de la ya mencionada participación de *synprint* en la colocación de las vesículas y los canales de  $\text{Ca}^{2+}$ , la interacción entre el *synprint* y las proteínas del complejo SNARE también fue implicada en la modulación de los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  y en la localización de los mismos en la membrana plasmática (Zhong y col., 1999; Mochidas y col., 2003; Zamponi, 2003; Jarvis y Zamponi, 2005; Jarvis y Zamponi, 2007). En resultados previos de nuestro laboratorio (ver figura 2.1) se observó que más del 50% de la  $\text{ICa}^{2+}$  en nuestras células es proporcionada por el canal tipo L, mientras que el resto es proporcionado principalmente por los canales P/Q. Por otro lado, no se observó ninguna evidencia de la presencia de los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  tipo N (Álvarez y col., 2008). Utilizamos el bloqueante del canal L (Nitre) y del P/Q (Aga) para estudiar la contribución de estos dos subtipos de canales de  $\text{Ca}^{2+}$  a la corriente total, en células  $\text{Syn}^+$  en comparación con las células no transfectadas. En la figura 5.8A se grafica el pico de la  $\text{ICa}^{2+}$  en función del voltaje aplicado (curva I-V) en células  $\text{Syn}^+$  no tratadas con ninguna droga, en células  $\text{Syn}^+$  incubadas con Aga ( $\text{Syn}^+ + \text{Aga}$ ), y células  $\text{Syn}^+$  incubadas con Nitro ( $\text{Syn}^+ + \text{Nitro}$ ). Mientras que Aga redujo perceptiblemente las  $\text{ICa}^{2+}$  en células  $\text{Syn}^+$  (hasta el 68 %, medido en el pico máximo, a +10 mV), un efecto mayor fue observado con Nitro, que redujo las  $\text{ICa}^{2+}$  hasta el 30 % de  $\text{Syn}^+$ . Por otro lado, en la figura 5.8B, se representan las curvas I-V obtenidas bajo las mismas situaciones experimentales que en la figura 5.8A, pero para células no transfectadas. Para estas últimas Aga y Nitro redujeron a las  $\text{ICa}^{2+}$  al 68% y 33% de los valores controles, respectivamente (Figura 5.8B). Podemos observar que las contribuciones relativas de los subtipos de canales de  $\text{Ca}^{2+}$  a la  $\text{ICa}^{2+}$  total en  $\text{Syn}^+$  son similares a los obtenidos en las células control. Estos resultados confirmaron que los canales tipo L son los dominantes en nuestra preparación, y además demostraron que la transfección del *synprint* no modificó la proporción en la que participan estos dos subtipos de canales en la corriente total.

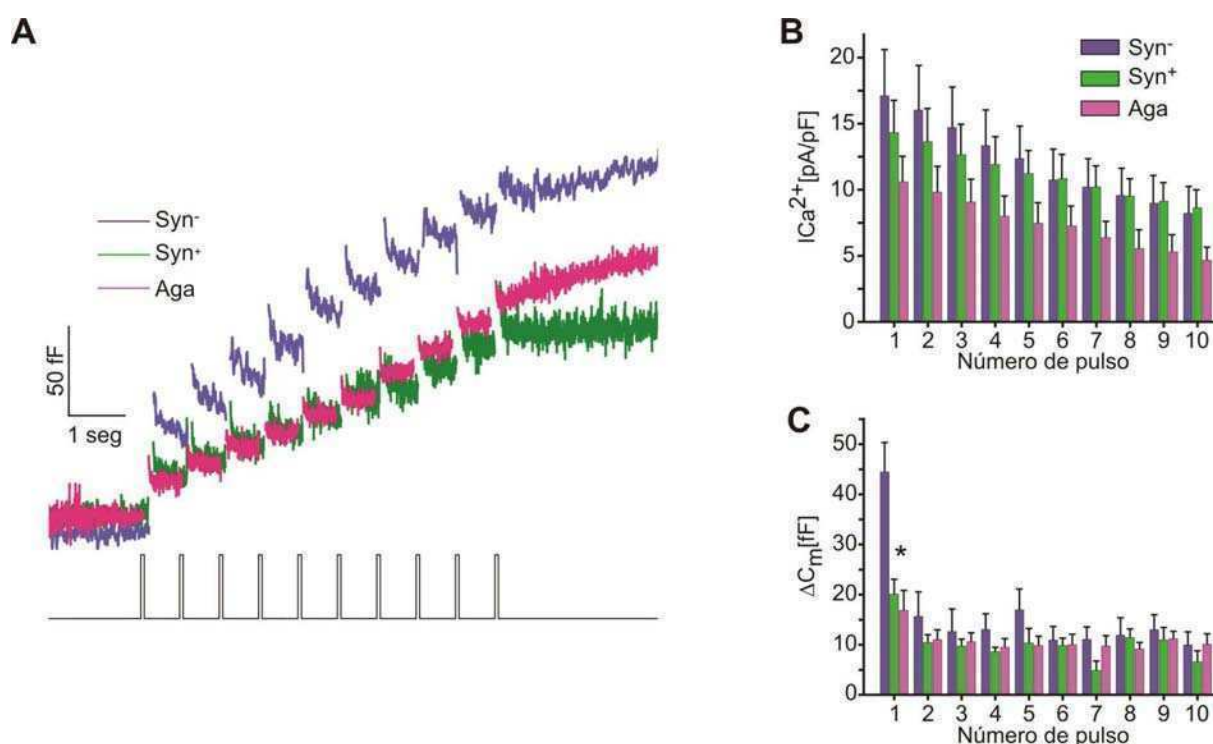


**Figura 5.8** - Efecto de la transfección con el péptido synprint en las  $I_{Ca^{2+}}$ . Pulsos despolarizantes con una duración de 50 mseg desde un potencial de mantenimiento de -80 mV hasta potenciales entre -60 y +50mV a intervalos de 10 mV fueron aplicados en células transfectadas con synprint ( $Syn^+$ ) y en células controles (sin protocolo de trasfección). En ambas condiciones las células fueron incubadas con Aga (200 nM) o con Nitro (10 $\mu$ M) por lo menos durante 5 minutos y luego se aplicó el mismo protocolo en experimentos independientes. En los gráficos se muestran los picos de las  $I_{Ca^{2+}}$  en función del potencial aplicado. (A) En esta figura se muestra el promedio de las corrientes en células transfectadas con synprint ( $Syn^+$ ). El pico de la corriente máxima, a 10 mV, es reducida al 64% con Aga ( $Syn^+ + Aga$ ,  $n=9$ ) respecto de la condición control, ( $n=9$ ) y con Nitro al 24% ( $Syn^+ + Nitro$ ,  $n=5$ ). (B) Promedio de las corrientes en células controles. Aga inhibió la corriente a un 68% (Control+Aga,  $n=9$ ) y Nitro a un 33% (Control + Nitro,  $n=5$ ) de la condición control ( $n=11$ ).

### 5.3.3 Respuesta exocitótica a trenes de despolarizaciones en células transfectadas con synprint

En esta sección estudiamos el efecto de la transfección con synprint sobre la exocitosis inducida por trenes compuestos por pulsos despolarizantes de 50 mseg aplicados a una frecuencia de 2Hz. Este tipo de protocolo de estimulación induce en su primera fase la fusión de vesículas altamente acopladas al estímulo, pero debido a la acumulación de  $Ca^{2+}$

residual a lo largo del tren genera finalmente la fusión de una población más extensa de vesículas (próxima en tamaño a RRP), independientemente si co-localizan o no con los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  (Marengo, 2005; Álvarez y col., 2008). Esta estimulación se aplicó en células  $\text{Syn}^-$ ,  $\text{Syn}^+$  y en las células incubadas con Aga (sin pasar por protocolo de transfección). Las densidades de las  $\text{ICa}^{2+}$  promediadas en los 10 pulsos del tren (Figura 5.9B) en células  $\text{Syn}^+$  no resultaron significativamente menores que las obtenidas en las células  $\text{Syn}^-$ , mientras que el uso de Aga provocó una reducción significativa ( $p < 0,05$ ) respecto a  $\text{Syn}^-$ . Por otro lado, mientras, el  $\Delta C_m$  total final del tren fue de  $161 \pm 20$  fF para células  $\text{Syn}^-$  (Figura 5.9A), en las células  $\text{Syn}^+$  y en las tratadas con Aga el tren provocó un  $\Delta C_m$  menor ( $90 \pm 16$  fF y  $98 \pm 17$  fF, respectivamente, figura 5.9A). Este efecto se debe en buena medida a la inhibición de la exocitosis sincrónica, la cual está altamente acoplada al estímulo (Figura 5.9C). Solamente para el primer pulso del tren, la transfección con *synprint* o el tratamiento con Aga disminuyeron a menos del 50% la exocitosis respecto del valor obtenido en  $\text{Syn}^-$ . Las diferencias obtenidas entre el control y para la exocitosis sincrónica del primer pulso en las células  $\text{Syn}^+$  y con Aga fueron de  $25 \pm 2$  fF y  $27 \pm 2$  fF para  $\text{Syn}^+$  y Aga respectivamente, y las diferencias acumulativas de los primeros 5 pulsos fueron  $44 \pm 4$  fF y  $45 \pm 4$  fF para los mismos tratamientos. Una vez más, es interesante observar que la transfección con *synprint* produjo un efecto similar sobre la exocitosis que la inhibición por Aga de los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  tipo P/Q. Estos resultados también apoyan nuestra hipótesis, de que la disminución de la exocitosis en células  $\text{Syn}^+$  se puede explicar por el desacople de las vesículas de IRP a la corriente tipo P/Q.

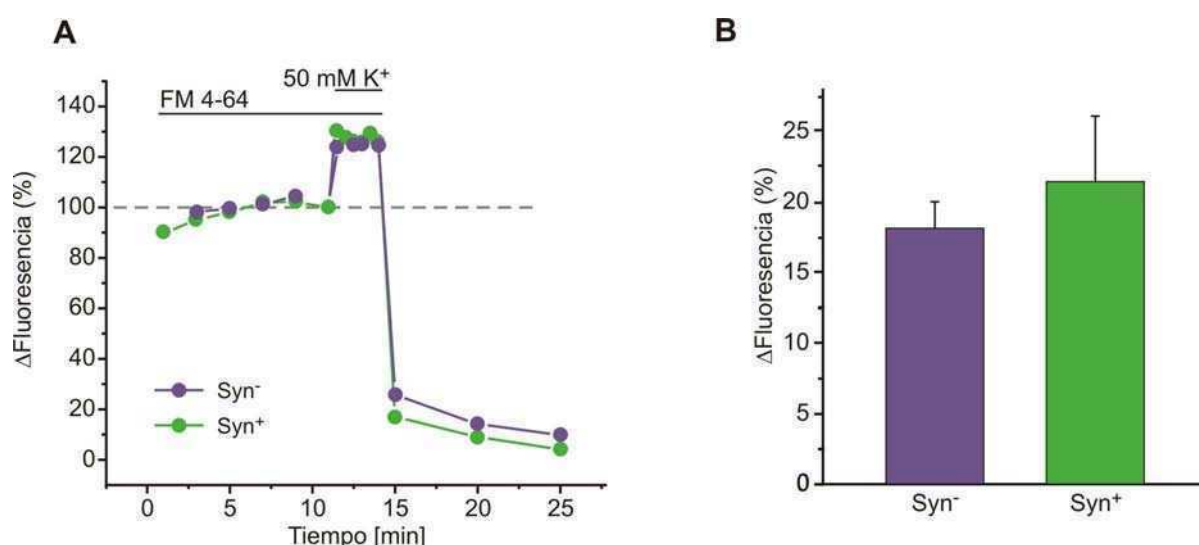


**Figure 5.9 - Efecto de synprint sobre la exocitosis generada por un tren de despolarizaciones.** (A) En la figura se comparan las respuestas exocitóticas de células sometidas a un tren de 10 pulsos de 50 msec (2Hz), para células Syn<sup>+</sup> (n=6), Syn<sup>-</sup> (n=7) y células control (sin pasar por la transfección) con Aga (Aga) (n=13). Las curvas representan los promedios obtenidos punto a punto para cada condición. (B) En el gráfico de barras se representan los promedios de los picos de las densidades de las  $ICa^{2+}$  para cada condición. Las densidades de las  $ICa^{2+}$  en Syn<sup>-</sup> no fueron significativamente reducidas en comparación con las de Syn<sup>+</sup>, mientras que la aplicación de Aga redujo significativamente la  $ICa^{2+}$  promedio para los 10 pulsos en un 46% respecto del Syn<sup>-</sup> ( $p < 0,05$ ). (C) La respuesta sincrónica, definida como el  $\Delta C_m$  que ocurre durante el pulso, se representa en el gráfico de barras de la figura para cada pulso y para las tres condiciones mencionadas. La respuesta sincrónica, fue medida como la diferencia entre valores promediados, en una ventana temporal de 100 msec, antes y después del pulso. Para calcular el promedio después de la despolarización, los primeros 100 msec son descartados para evitar el efecto de las corrientes de compuerta de Na<sup>+</sup> (Horrigan y Bookman, 1994, Moser y Neher, 1997a). Este análisis mostró una reducción significativa en el primer pulso en las células Syn<sup>+</sup> y Aga respecto al control ( $p < 0,001$ ).

### ***5.3.4 Efecto de la transfección con synprint sobre la exocitosis masiva medida con FM4-64***

Los resultados obtenidos en células Syn<sup>+</sup> apoyan la hipótesis de que el *synprint* de los canales P/Q Ca<sup>2+</sup> es fundamental para mantener un acople funcional entre estos canales y la maquinaria exocitótica asociada a las vesículas del IRP. Sin embargo, no podemos evitar plantearnos la posibilidad de que la capacidad secretoria global de las células Syn<sup>+</sup> esté colapsada parcialmente. Los resultados de la figura 5.9 parecerían refutar esa posibilidad. Sin embargo, para estar más seguros decidimos evaluar esta alternativa en experimentos donde se induzca un proceso de exocitosis realmente masivo. Para esto medimos el aumento en la fluorescencia asociada al fluoróforo FM 4-64 (presente en el baño durante 15 minutos previos al estímulo, ver detalles en métodos) que se produce en respuesta a la aplicación de 50 mM de K<sup>+</sup> durante 3 minutos, sobre células Syn<sup>+</sup> y Syn<sup>-</sup>. Este tipo de protocolo libera una porción importante de las vesículas liberables contenidas en las células cromafines (Perez Bay y col., 2007). Utilizamos esta metodología porque es esperable que la exocitosis inducida por estos estímulos largos sea subestimada por las mediciones de capacitancia, como consecuencia de la endocitosis que se produce de manera simultánea. En la figura 5.10A se muestran ejemplos representativos de registros obtenidos en una célula control (Syn<sup>-</sup>) y una célula de Syn<sup>+</sup>. Las barras de la figura 5.10B representan el aumento medio en la fluorescencia, expresada como porcentajes de la fluorescencia celular antes del estímulo de alto potasio, en las células Syn<sup>-</sup> y Syn<sup>+</sup>. En promedio, no se observaron diferencias significativas entre estos dos grupos, indicando que la expresión del *synprint* no afecta a la capacidad general de la célula para liberar vesículas.





**Figura 5.1** - La exocitosis fue medida como el aumento en la fluorescencia debido a la incorporación del fluoróforo FM4-64 a la membrana de las vesículas fusionadas (ver sección de 4.3). **(a)** Ejemplos de la respuesta medida frente a la aplicación de K<sup>+</sup> 50 mM en el baño durante 3 minutos en células Syn<sup>-</sup> y Syn<sup>+</sup>. Los puntos representan el promedio espacial de fluorescencia en la sección ecuatorial de la célula, previa resta de la fluorescencia de fondo. **(B)** El diagrama de barras sintetiza los resultados obtenidos en células Syn<sup>-</sup> (n = 10) y Syn<sup>+</sup> (n = 9), expresados como el aumento porcentual de la fluorescencia relación a los valores previos al estímulo (después de la substracción del fondo).

### 5.3.5 Discusión

Los resultados obtenidos en esta sección apoyan la hipótesis de que el *synprint* de los canales de Ca<sup>2+</sup> tipo P/Q es fundamental para mantener un acople funcional entre estos canales y la maquinaria exocitótica asociada a las vesículas que forman el IRP. El péptido *synprint* exógeno, al competir con el endógeno que forma parte del canal, produciría un desacople de las vesículas del IRP y los canales P/Q, llevando a estas vesículas a ubicarse a una distancia mayor del canal que en la condición control, lo que reduciría su probabilidad de liberación.

La reducción de la exocitosis del IRP por el agregado del *synprint* exógeno no puede ser atribuido a una diferencia en las corrientes, ya que las células transfectadas con *synprint* no mostraron diferencias ni en las corrientes, ni en la contribución de los subtipos de canales de Ca<sup>2+</sup> a estas corrientes, en comparación con las condiciones controles. Este resultado es importante de resaltar, ya que se han observado evidencias de que el *synprint* podría estar involucrado en la regulación del canal de Ca<sup>2+</sup> a través de su interacción con syntaxina. En

particular ha sido descrito que la co-expresión de syntaxina con los canales P/Q y N disminuye la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  por estos canales debido a la estabilización del estado inactivado (Bezprozvanny y col., 1995; Wiser y col., 1996). En el caso de una transfección con *synprint* libre sería esperable que la interacción nativa del *synprint* con la syntaxina se disrumpiese por el péptido agregado, y por lo tanto, podría ocurrir que el influjo de  $\text{Ca}^{2+}$  sea mayor. Sin embargo esto no ocurrió en nuestros experimentos.

Otro posible efecto no deseado por el agregado de *synprint* sería que la capacidad exocitótica global de las células esté reducida debido a un efecto tóxico producido por la sobreexpresión de proteínas. Esta posibilidad se estudió aplicando despolarizaciones capaces de liberar una cantidad de vesículas que supere ampliamente el tamaño del IRP. Primero, se estudió el efecto de la transfección con *synprint* sobre la exocitosis inducida por la aplicación de despolarizaciones en forma de trenes, que como se observó en capítulos anteriores, es capaz de liberar el RRP y posiblemente algunas vesículas del SRP. La aplicación de este protocolo sobre las células  $\text{Syn}^+$  disminuyó notablemente la liberación del componente sincrónico, que se evidencia principalmente en el primer pulso, pero prácticamente no modificó la liberación del componente menos acoplado. La diferencia en el  $\Delta C_m$  al finalizar el tren entre las células  $\text{Syn}^-$  y  $\text{Syn}^+$  fue de  $\sim 70$  fF. Es interesante observar que el 35% de este valor puede ser explicado por la diferencia en el componente sincrónico del primer pulso, mientras que el 62% puede ser explicado por las diferencias en los cinco primeros. Por lo tanto fue el componente sincrónico altamente acoplado el que resultó más afectado en  $\text{Syn}^+$ . De cualquier manera se buscó otra estimulación que sea capaz de liberar una cantidad aun más masiva de vesículas que un tren. En nuestro laboratorio hemos comprobado que una despolarización con alto  $\text{K}^+$  por 3 minutos cumple con estas condiciones (Perez Bay y col., 2007). Los experimentos con alto  $\text{K}^+$  provocaron un aumento en la fluorescencia de 18% respecto a la fluorescencia de la membrana celular en reposo, y este valor no fue diferente en las células transfectadas con *synprint*. El número de vesículas exocitadas por medio de esta despolarización se puede calcular asumiendo una relación lineal entre la fluorescencia y la capacitancia celular. Suponiendo que el 100% de la fluorescencia en reposo corresponde a la totalidad de la capacitancia de la membrana celular (6 pF en promedio), un valor de 18% de fluorescencia corresponde a 1080 fF. Este valor a su vez, equivale a 830 vesículas (tomando un valor de 1,3 fF por vesícula (Moser y Neher, 1997b)) Este número de vesículas liberadas correspondería a la liberación de la totalidad del RRP, del SRP y una proporción importante del UPP (Ashery y col., 2000; Heinemann y col., 1993). Este resultado también indica que este tipo de protocolo genera una liberación masiva de vesículas de aproximadamente el 16 % del total de vesículas

liberables en las células cromafines (suponiendo un número total de 5000 vesículas) (Perez Bay y col., 2007; Ashery y col., 2000; Phillips y col., 1983; Heinemann y col., 1993). Por lo tanto, este resultado demuestra que la capacidad de la célula para exocitar sus vesículas frente a estímulos muy intensos que comprometen la liberación de una cantidad muy superior de vesículas que el IRP no se modificó en las células transfectadas con *synprint*.

Otro punto importante que se observó en los resultados de esta sección es que la condición  $\text{Syn}^+$  genera un efecto inhibitorio similar sobre la exocitosis del IRP que el Aga, pero sin modificar las corrientes. Este resultado se puede observar tanto en la respuesta al protocolo de pulsos pareados utilizado para estimar IRP, como en la respuesta a trenes de despolarizaciones. A su vez, la eficiencia de la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  para exocitar vesículas en las células tratadas con Aga y las  $\text{Syn}^+$  resultó ser la misma. Mientras que Aga afecta la entrada de calcio por los canales P/Q, la transfección de  $\text{Syn}^+$  alteraría la distancia entre canales y vesículas. Un resultado similar pero con los canales N se obtuvo en cultivo de tejido neuromuscular de embriones de *Xenopus* en los cuales se inyectó el péptido *synprint*. La inyección del péptido redujo la liberación de neurotransmisor en un 25%, obteniéndose un efecto similar por medio del bloqueo de los canales N con  $\omega$ -conotoxina-GVIA, el (Rettig y col., 1997).

Los resultados experimentales fueron simulados computacionalmente, y se estimó la distancia promedio a la cual se desplazarían las vesículas de las células transfectadas con *synprint*. Usando el mismo modelo que nos permitió ajustar los  $\Delta C_m$  para pulsos de distintas duraciones en la sección de resultados anterior, se modificó la distancia entre el canal y vesícula (que en condiciones control es de 30 nm) para poder reproducir los datos experimentales de las células  $\text{Syn}^+$ . Una distancia de 60 nm del canal es la que mejor reproduce los valores experimentales del  $\text{Syn}^+$ . Sin embargo, es probable que las vesículas desacopladas por el *synprint* se ubiquen respecto a los canales en forma aleatoria. La distancia de 60 nm, por lo tanto, debe ser interpretada como una distancia promedio. Esta distancia implicaría que algunas de las vesículas no sean desplazadas de su posición de 30 nm y algunas se reubiquen a distancias mayores de 60 nm. Partiendo de que el agregado de *synprint* reduce la exocitosis de IRP en un 60% (ver figura 5.6B-ii), se simuló la liberación del IRP dejando el 40% de este *pool* fijo en la posición a 30 nm, y estableciendo la posición del 60% restante de las vesículas a una distancia de 100 nm. Esta simulación reprodujo aun más fehacientemente los valores experimentales. Este resultado también es consistente con los resultados obtenidos en otro modelo teórico en el que se simuló el efecto del *synprint* sobre la transmisión sináptica en el tejido neuromuscular de *Xenopus*. Los autores

encontraron que la reducción en la transmisión sináptica es compatible con que el 70% de las vesículas se desacoplaron de sus canales por la acción del péptido *synprint* exógeno (Rettig y col., 1997).

#### ***5.4 Participación del IRP en el rango de frecuencias fisiológicas de disparo de la célula cromafín***

En los capítulos anteriores se estudiaron las características del acople entre el estímulo y la exocitosis de las vesículas del IRP, los canales intervinientes, y el mecanismo responsable de este acople. En una situación de reposo, la frecuencia de disparo de estas células es de aproximadamente 0,5 Hz, mientras que en condiciones de estrés puede aumentar a ~10 Hz (Kidokoro y Ritchie, 1980), generando la liberación masiva de adrenalina y otras sustancias activas (Winkler y Westhead, 1980). Frente a este escenario nos preguntamos cuál es el papel fisiológico de vesículas tan altamente acopladas al estímulo, como el IRP en estas células. Entre las posibles respuestas, se ha especulado que este *pool* comprendería específicamente a las vesículas capaces de liberarse frente a un PA (Chan y col. 2005). La pregunta que deberíamos plantearnos a continuación es a que rango de frecuencias de PA es capaz de responder el IRP de manera sostenida. Esto dependerá en gran medida de su velocidad de recuperación luego de haber sido deprimido, proceso que a su vez podría ser modificado por distintas variables, entre ellas el mismo  $\text{Ca}^{2+}$  residual, que podría ser importante a ciertas frecuencias aún moderadas (Marengo y Monck, 2003; Smith y col., 1998). Como hipótesis de mínima, se especuló que debido a su alto acoplamiento con los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  el IRP puede servir como un mecanismo de liberación basal, es decir a bajas frecuencias, de catecolaminas por parte de las células cromafines, el cual se ejecutaría con alta eficiencia y poco costo energético (Olivos Oré L. y Artalejo A.R, 2004). A dicha baja frecuencia (0,5 Hz) no habría acumulación significativa de  $\text{Ca}^{2+}$  residual, y por lo tanto sería necesario un mecanismo altamente acoplado al estímulo como es el IRP para que la exocitosis se lleve a cabo. La posibilidad de que el IRP responda en un rango más amplio de condiciones fisiológicas dependerá por lo tanto de su cinética de recuperación y de la plasticidad de los mecanismos de regulación a los que esta esté sometida. En general, podemos decir que la participación fisiológica real del IRP no ha sido testada, ni aún a bajas frecuencias. Pero es claro que la capacidad de reciclado es aun más limitante en una situación de estrés, donde la célula debe responder a trenes de alta frecuencia.

En esta sección se estudió la capacidad del IRP de responder a una estimulación repetitiva, como ocurre en la célula cromafín en vivo, en el rango de frecuencias fisiológicas. Para estudiar esto, se empezó por caracterizar la cinética de recuperación del IRP y su posible regulación por  $\text{Ca}^{2+}$ . Luego se estudió su respuesta ante estímulos que se aproximan más a lo fisiológico, empezando por un PAs único (despolarización con forma aproximada a potencial de acción, ver sección 4.2.7), para luego pasar a trenes de distintas frecuencias de PAs.

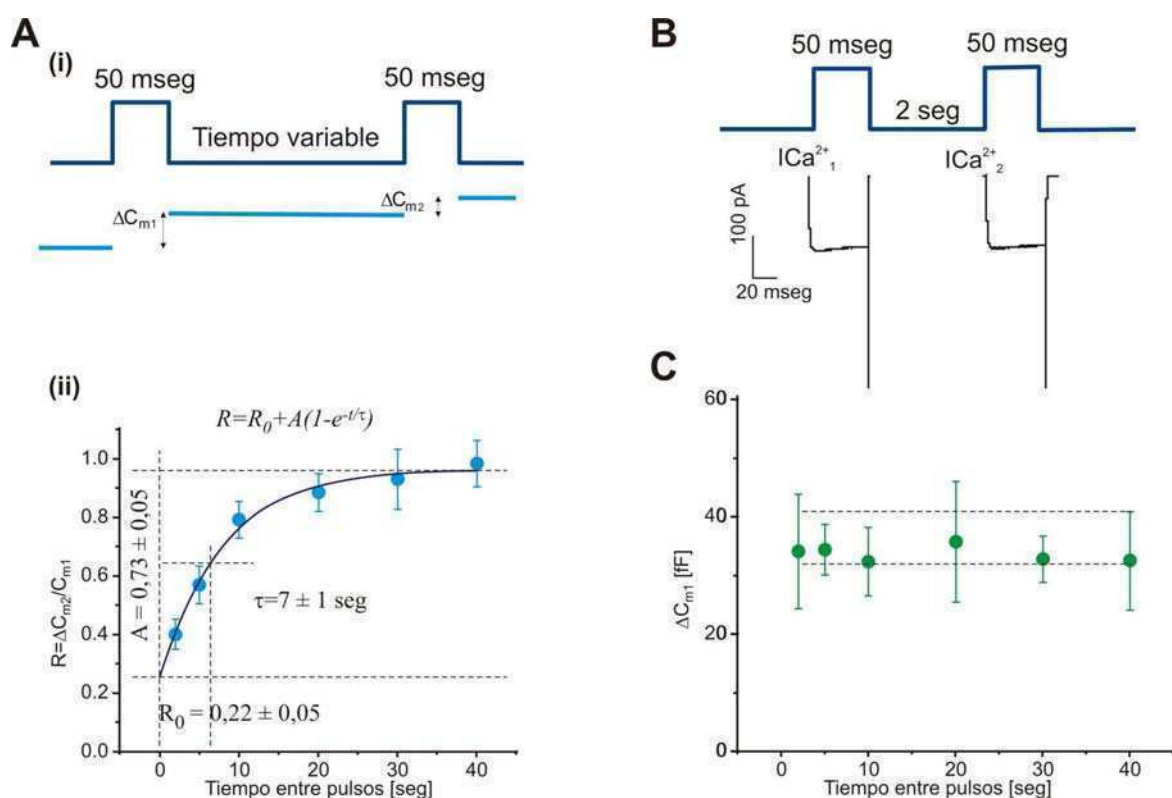
### 5.4.1 Recuperación del IRP

Para estudiar la recuperación del IRP en función del tiempo se utilizó un protocolo que consiste en la aplicación de un pulso despolarizante que libera aproximadamente la totalidad del *pool*, y después de un tiempo variable, se aplicó otra despolarización idéntica (figura 5.11A-i). La exocitosis inducida por este segundo pulso nos indicará el grado de recuperación de este *pool*, utilizando la exocitosis resultante del primer estímulo como referencia. Una condición importante es que la segunda despolarización genere la misma entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  que la primera. Los pulsos despolarizantes utilizados para este protocolo fueron de 50 mseg, ya que como se observó en los resultados anteriores, este pulso es capaz de liberar prácticamente todo el IRP. Llamando  $\Delta C_{m1}$  y  $\Delta C_{m2}$  a los aumentos en capacitancia inducidos por esas despolarizaciones, utilizaremos a la relación  $R = C_{m2}/C_{m1}$  como estimador de la recuperación. Los resultados obtenidos para los valores de  $R$  en función del tiempo entre los dos estímulos se presentan en la figura 5.11A-ii. La respuesta, para tiempos entre 2 y 40 seg, muestra un comportamiento de saturación, con un valor asintótico que no difiere estadísticamente de 1, lo que sugiere que luego de liberado el IRP se recupera en su totalidad. La curva experimental fue ajustada con una función de la forma  $R = R_0 + A(1 - e^{-t/\tau})$  (Figura 5.11A-ii). El tiempo característico de esta curva, que representa el intervalo de tiempo para el cual  $R$  es 0,63, fue de  $7 \pm 1$  seg y el valor de la recuperación ajustado ( $R_0 + A$ ) a tiempo infinito fue de  $0,95 \pm 0,05$ . El parámetro  $R_0$  es el valor de la recuperación a tiempo cero, el cual se estimó en un valor de 0,2 a partir del ajuste, indicando que una fracción del IRP se recupera en forma casi inmediata. Este valor es similar al observado por Moser y Neher (1997a) y por Smith y col. (1998) en la recuperación del RRP. Estos autores explicaron este comportamiento proponiendo la existencia de una fase transitoria veloz de recuperación dependiente del  $\text{Ca}^{2+}$  remanente luego de la estimulación (Smith y col., 1998). Otra posible explicación de un valor de  $R_0$  mayor a cero, es que a tiempos cortos entre pulsos el  $\text{Ca}^{2+}$  que ingresa por la segunda estimulación se suma al  $\text{Ca}^{2+}$  que ingresó por la primera que no llega a disiparse, generando mayor liberación. Ambas

posibilidades son compatibles con los datos experimentales (no mostrados) de recuperación del IRP a tiempos menores a 2 seg para los cuales se observaron un valor máximo de R de 0,7 a 300 mseg que para tiempos mayores decrece hasta llegar a un mínimo a los 2 seg. Todos estos datos sugieren que la recuperación podría ser un proceso bifásico compuesto por una fase transitoria hasta aproximadamente los 2 seg y una fase lenta después de este tiempo.

Como ya fue mencionado, es importante descartar que la cinética mostrada en la figura 5.11A-ii no esté influida por una disminución en la entrada de calcio en el segundo pulso respecto del primero, producida por un mecanismo de inactivación de las  $ICa^{2+}$ . Esta diferencia podría causar menor exocitosis en el segundo pulso y por lo tanto una disminución en la recuperación a tiempos cortos, enlenteciendo tal vez la recuperación aparente. Esta posibilidad fue descartada, ya que la comparación entre las corrientes de los pulsos de 50 mseg no mostró diferencias significativas para ningún intervalo de tiempo utilizado. En la figura 5.11B se muestran como ejemplo las  $ICa^{2+}$  provocadas por un par de pulsos de 50 mseg separados por 2 seg. Los valores promedios de las corrientes generadas por los pulsos de 50 mseg entre el primero y el segundo de todas los intervalos de corrientes no son significativamente distintos ( $ICa^{2+}_1=157 \pm 10$  pA y  $ICa^{2+}_2=150 \pm 11$  pA,  $n=109$ ). Otro posible problema que podría afectar a estos experimentos es que los valores de exocitosis generados por el primer pulso no logren generar la liberación total del IRP. En ese caso la recuperación de los pulsos más cortos estaría sobreestimada. Por esta razón, los experimentos en los que los valores de exocitosis para  $\Delta C_{m1}$  estuvieron fuera de los límites del valor esperado para el IRP ( $B_{min}$  y  $B_{max}$ ) fueron descartados del análisis. Tomando este criterio se eliminaron 8 experimentos de un total de 82. El promedio de los  $\Delta C_m$  medidos para el primer pulso ( $\Delta C_{m1}$ ) para los experimentos en los que se aplicó luego diferentes tiempos de recuperación se muestran en la figura 5.11C, donde se puede observar que los valores son consistentes con el tamaño el IRP estimado por  $B_{max}$  y  $B_{min}$ .

Es posible que el IRP y su recuperación sean regulados por el calcio citosólico. Existen algunas evidencias que manifiestan que un aumento en el  $Ca^{2+}$  citosólico estimularía la aproximación de las vesículas hacia los canales de  $Ca^{2+}$ , aumentando el tamaño y/o el relleno de IRP (Becherer y col., 2003; Marengo, 2005). Por otro lado es sabido que el  $Ca^{2+}$  regula el tamaño de RRP (Voets col., 2000; Smith y col., 1998) y en consecuencia por simple acción de masas podría afectar al IRP. Estas alternativas serán evaluadas en las próximas secciones.



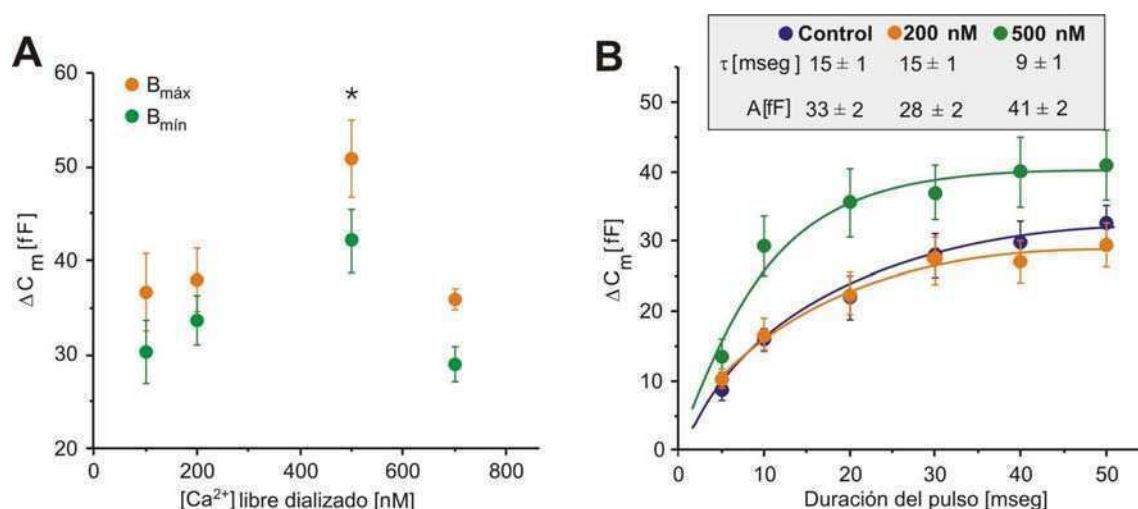
**Figura 5.11 – Recuperación del IRP.** (A) (i) En este gráfico se esquematiza el protocolo que se utilizó para estudiar la recuperación del IRP. El protocolo consiste en 2 pulsos de 50 msec separados por un tiempo variable entre 2 y 40 seg. El número de experimentos para los distintos tiempos oscila entre 11 y 14 con un total de 82 experimentos en toda la curva. (ii) En esta figura se grafica la recuperación en función del tiempo entre pulsos, esta curva muestra un comportamiento exponencial. Los valores experimentales se ajustaron con una función de la forma presentada en el gráfico. El parámetro  $R_0$  representa el valor de la recuperación a tiempo cero,  $A$  es el valor de la asíntota, que representa el valor de  $R$  para un tiempo infinito entre pulsos y  $\tau$ , es el tiempo característico, para el cual la amplitud es el 63% de  $A$ . (B) En esta figura se muestra un ejemplo de las  $ICa^{2+}$  provocadas por dos pulsos de 50 msec separados por 2 seg. (C) En esta figura se grafica la exocitosis producida por los primeros pulsos del protocolo ( $\Delta C_{m1}$ ) en función del tiempo entre pulsos. Estos valores no son significativamente distintos entre si, y además estos valores están dentro de los límites obtenidos para el IRP ( $B_{m\acute{a}x}$  y  $B_{m\acute{i}n}$ ) representados por las líneas punteadas.

### 5.4.2 Efecto de la concentración de calcio citosólica sobre el IRP

El efecto de la concentración citosólica de  $Ca^{2+}$  sobre el tamaño del IRP se estudió dializando el medio intracelular desde la pipeta de patch con diferentes concentraciones de

$\text{Ca}^{2+}$ . Las concentraciones de calcio introducidas en la pipeta fueron calculadas teniendo en cuenta la concentración y propiedades cinéticas del EGTA, de forma que el calcio libre sea aproximadamente el deseado (ver sección 4.2.6). Los valores de  $\text{Ca}^{2+}$  libre calculado están en el rango entre 100-700 nM. Para estimar el IRP se utilizó el protocolo de pulsos pareados de 10 mseg, separados por 300 mseg, mencionado anteriormente (Figura 5.12A) (ver sección 4.2.7).

A partir de estos experimentos se obtuvo una curva del tamaño del IRP en función de la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  libre (Figura 5.12A). En esta curva no se observa que existan cambios significativos entre los valores obtenidos para las concentraciones de 100 y 200 nM (Figura 5.12A). Por otro lado, el IRP aumenta su tamaño significativamente a 500 nM de  $[\text{Ca}^{2+}]$  libre en comparación con concentraciones menores o iguales a 200 nM, y cuando la  $[\text{Ca}^{2+}]$  aumenta a valores mayores a 500 nM, el IRP disminuye nuevamente. Esta disminución se debería a que en esta condición de  $\text{Ca}^{2+}$  libre alto la exocitosis se encuentra favorecida y por lo tanto se produciría el vaciamiento de este *pool* (Smith y col., 1998).



**Figura 5.12** - Efecto del  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico libre sobre el tamaño del IRP (**A**) Curva de los límites medidos para el tamaño de IRP en función de la concentración estimada de calcio libre dializada por la pipeta (entre 100 y 700 nM). El número de experimentos varía entre las distintas concentraciones entre 10 y 15 llegando a un total de 71 experimentos en toda la curva. Mientras que para valores menores o iguales a 200 nM no hay cambios significativos, con 500 nM se observa un aumento significativo del tamaño del IRP, y para valores mayores se observa una reducción, probablemente debido a la liberación espontánea de las vesículas. (**B**) El mismo efecto del calcio se observa en los



$\Delta C_m$  medidos frente a pulsos de duraciones menores o iguales a 50 mseg. Las líneas continuas corresponden a ajustes monoexponenciales de la forma  $A \cdot (1 - e^{-t/\tau})$ . Estos ajustes muestran valores similares de IRP entre 200 nM y control (sin agregado de  $Ca^{2+}$  en la pipeta) mientras que con 500 nM la amplitud de la curva aumenta en más de un 30%.

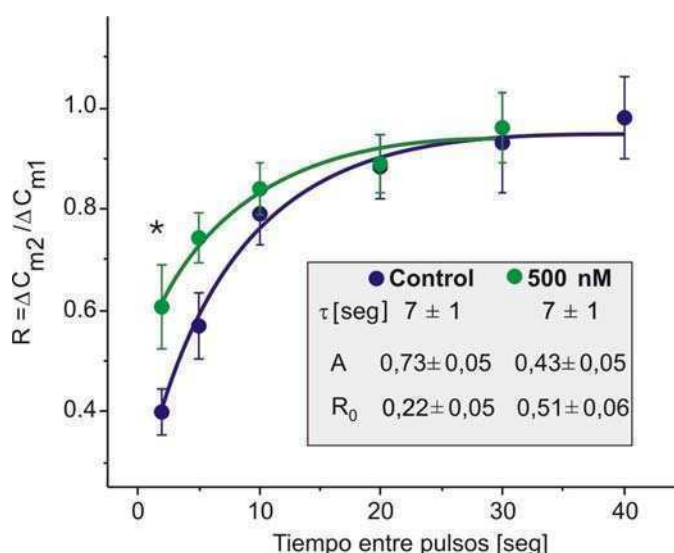
El aumento del tamaño del IRP con una concentración citosólica de  $Ca^{2+}$  de 500 nM también se observó en respuesta a pulsos de despolarizaciones iguales o menores a 50 mseg. En la figura 5.12B se grafica la relación entre los  $\Delta C_m$  y la duración de dichos pulsos. Se realizaron ajustes exponenciales a las curvas obtenidas a 200 nM y 500 nM. Como se mostró en la figura 5.1A, el valor de A es usualmente utilizado como estimación del IRP. Los resultados obtenidos por los ajustes muestran un aumento en el tamaño y una disminución en el tiempo característico para 500 nM en comparación a 200 nM de  $Ca^{2+}$  libre. Además, el promedio de todos los experimentos de duraciones mayores e iguales a 20 mseg, a partir de los cuales se observa la saturación de la curva, en cada condición mostró que con 500 nM el  $\Delta C_m$  ( $39 \pm 3$  fF) es significativamente mayor que en las condiciones, control ( $30 \pm 2$  fF) y 200 nM ( $28 \pm 2$  fF) ( $p < 0,05$ ). Por otro lado, la comparación de los datos control (tomados de la figura 5.2A) con la curva realizada a 200 nM de calcio libre intracelular no muestra diferencias en los parámetros del ajuste ni en el promedio de los experimentos de duraciones mayores e iguales a 20 mseg (Figura 5.12B).

### ***5.4.3 Papel regulador del calcio citosólico sobre la velocidad de recuperación***

El siguiente paso fue estudiar si el  $Ca^{2+}$  intracelular podría también estar regulando la velocidad de recuperación del IRP. Se realizaron experimentos midiendo la recuperación con el protocolo de dos pulsos de 50 mseg separados por un tiempo variable (al igual que en la figura 5.12B), pero modificando el calcio intracelular entre experimentos independientes (Figura 5.13). Esta curva fue ajustada con una función exponencial al igual que en la curva de la figura 5.11A-ii. La comparación de los parámetros de los ajustes entre el control (tomado de la figura 5.11A-ii) y 500 nM mostraron un aumento en el valor de  $R_0$  de 0,2 a 0,5 respectivamente, mientras que el tiempo característico y el valor de la asíntota ( $A + R_0$ ) fueron similares (ver tabla en figura 5.13). Además, el valor de R a un tiempo de 2 seg resultó significativamente mayor en presencia de 500 nM de  $Ca^{2+}$  basal en comparación con

la condición control. En resumen, podemos decir que el aumento del  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular a 500 nM modifica la cinética global de recuperación de IRP gracias de un aumento marcado de la recuperación para tiempos menores a 2 seg

Los resultados de las dos últimas secciones indican la existencia de mecanismos de regulación del tamaño y de la recuperación del IRP mediado por el  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico en el rango de concentraciones fisiológicas, con un efecto máximo a una concentración de 500 nM. Sin embargo, como sabemos la estimulación fisiológica que reciben estas células es a través de PA. Es altamente probable que las vesículas que se liberan frente a un PA, debido a su corta duración, provengan del IRP. En las siguientes secciones caracterizaremos la respuesta exocitótica frente a un potencial de acción único y su recuperación en relación al IRP.



**Figura 5.13-** Dependencia de la recuperación del IRP con el calcio intracelular. En este figura se compara la recuperación del IRP entre la condición control (tomada de la figura 5.11A-ii)(sin agregado de  $\text{Ca}^{2+}$ ) con experimentos realizados a una concentración estimada de 500 nM de  $\text{Ca}^{2+}$  libre ( $n=40$ ). Cuando la separación entre pulsos es de 2 seg los valores de R promedio fueron significativamente diferentes entre las células controles, sin agregado de  $\text{Ca}^{2+}$  ( $n=14$ ) y con el agregado de 500 nM de  $\text{Ca}^{2+}$  libre ( $n=9$ ) ( $p<0,05$ ). Las líneas continuas representan los ajustes exponenciales de las curvas, y en el inserto de la figura se muestran los valores obtenidos por los ajustes.

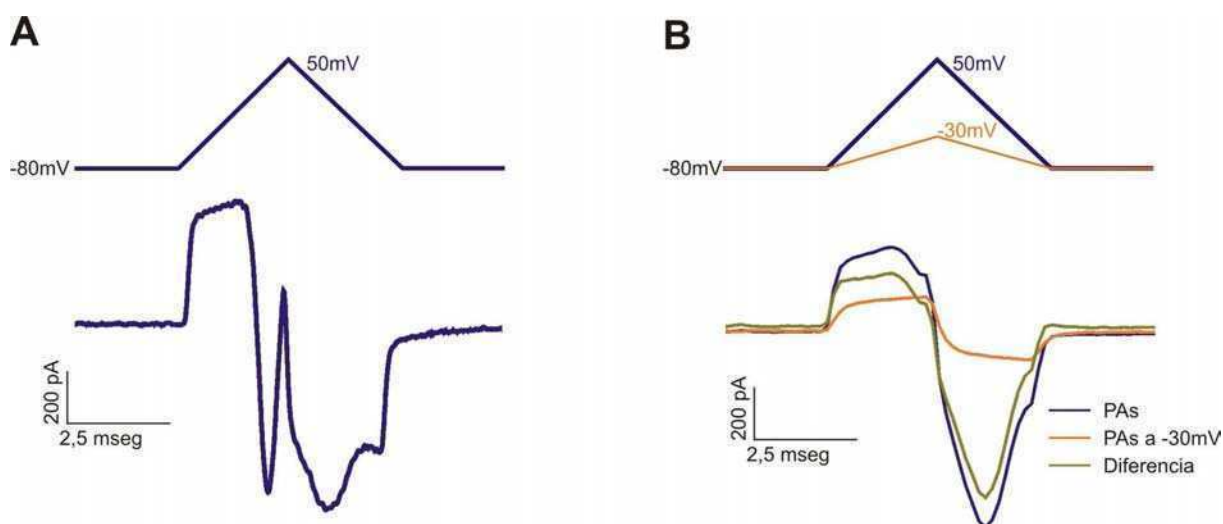
#### ***5.4.4 Exocitosis en respuesta a despolarizaciones que simulan potenciales de acción***

En los siguientes experimentos se caracterizó la respuesta exocitótica a pulsos despolarizantes que simularon la forma de un potencial de acción (PAs). El pulso despolarizante que se utilizó está formado por una rampa que parte del potencial de reposo en -80 mV y llega hasta un potencial de +50 mV en 2,5 mseg, y luego vuelve al potencial de reposo en el mismo tiempo (Chan y col., 2005) (Figura 5.14). Este protocolo produce una corriente muy rápida y otra más lenta, temporalmente separadas, como se puede observar en la figura 5.14A (trazado azul). Si se aplica TTX la corriente rápida desaparece (Figura 5.14B, trazado azul), por lo que concluimos que esta se asocia a una corriente de  $\text{Na}^+$ , mientras que la lenta estaría asociada a la de  $\text{Ca}^{2+}$ . Este perfil de corrientes de  $\text{Na}^+$  y  $\text{Ca}^{2+}$  con este tipo de estimulaciones coincide con lo observado por otros autores (de Diego, 2008; Chan y col., 2005). En los restantes experimentos de esta tesis las corrientes fueron medidas en presencia de TTX, y por lo tanto sólo medimos las  $\text{ICa}^{2+}$ .

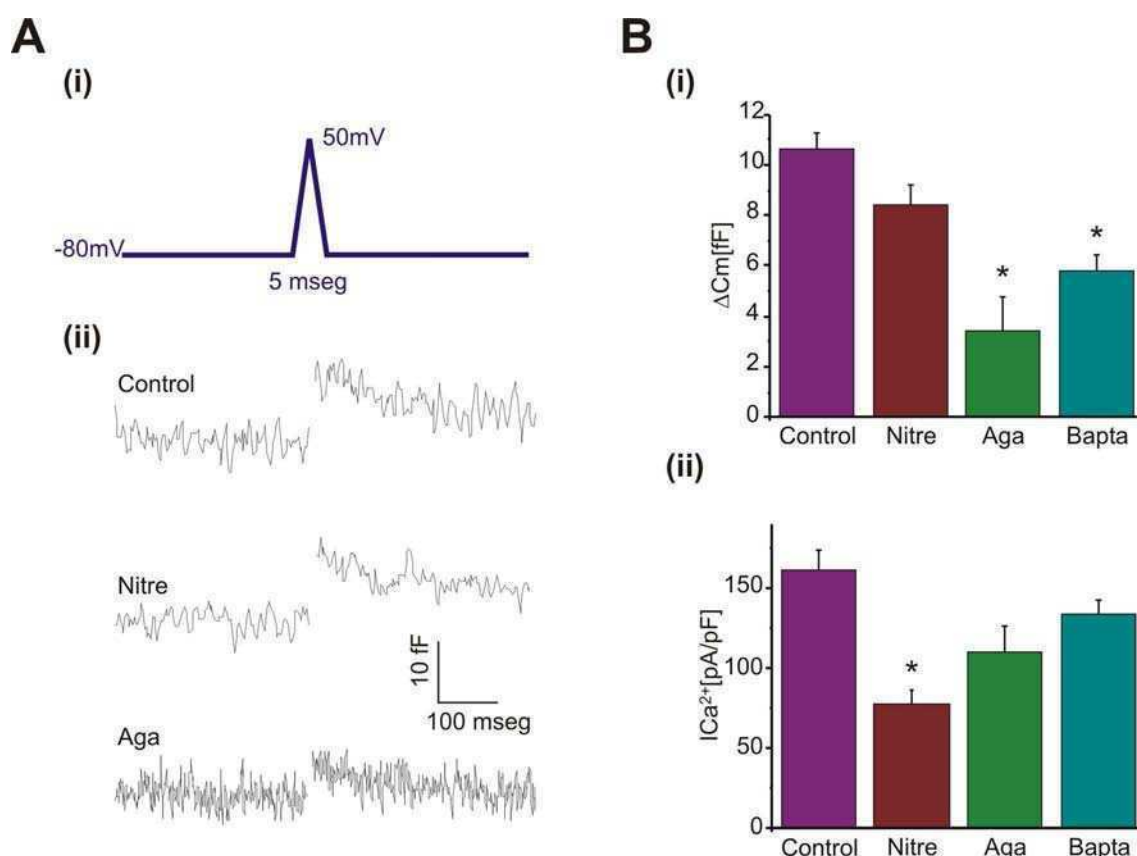
Teóricamente, el perfil de corriente de  $\text{Ca}^{2+}$  observado en el trazado de la figura 5.14B puede ser explicado de la siguiente manera. La probabilidad de apertura de los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  comienza a aumentar a partir de un potencial de membrana de -40 mV y aumenta hasta alcanzar el máximo a valores próximos a +40 mV (Fendwick y col., 1982). En la fase de subida del PAs se produce un aumento rápido en la probabilidad de apertura de los canales, pero no se genera una corriente apreciable porque la fuerza impulsora (la diferencia entre el potencial de membrana y el de reversión del  $\text{Ca}^{2+}$ ) es muy baja. Al comenzar la rampa descendente para volver al voltaje de reposo, la fuerza impulsora aumenta muy rápidamente y se produce una entrada masiva de calcio en un lapso muy corto.

La aplicación de un protocolo de la misma duración pero hasta un potencial máximo próximo al umbral de activación de los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  (-30 mV), produce una respuesta simétrica (es decir, idénticas fases de corriente positiva y negativa, figura 5.14B, en naranja) relacionada con las corrientes de compuerta de los canales de  $\text{Na}^+$  voltaje dependientes (Borst y Sakmann, 1998). La resta de la  $\text{ICa}^{2+}$  (en azul) menos la corriente de compuerta (en naranja) se observa en la figura 5.14B en verde. El efecto de las corrientes de compuerta producen una leve sobreestimación de la  $\text{ICa}^{2+}$ , con una contribución de un 14% en el pico y un 10% en la integral (n=10). Estos valores fueron utilizados para corregir el valor de las

corrientes. En promedio, el pico de la  $ICa^{2+}$  obtenido en condiciones control fue de  $981 \pm 75$  pA ( $n=34$ ), y la  $QCa^{2+}$  fue de  $1,6 \pm 0,1$  pC.



**Figura 5.14** – En esta figura se esquematiza el pulso despolarizante que simula el PA (PAs), y se muestran ejemplo de las corrientes que se obtienen por aplicación de dicho pulso. Este pulso consta de dos rampas, una que asciende desde  $-80$  mV a  $+50$  mV en  $2,5$  mseg, seguida de una segunda que decrece desde  $+50$  mV a  $-80$  mV en el mismo tiempo. Estos pulsos se encuentran representados en azul en la parte superior de las figuras A y B. En la parte inferior de (A) se representan un ejemplo representativo de corriente inducida por el PAs. Se observa que este tipo de estímulo induce una corriente rápida temprana de  $Na^{+}$  y una más tardía de  $Ca^{2+}$ . En la parte inferior de (B) se representa la corriente generada por un PAs en presencia de TTX (trazado azul). Con el fin de evaluar la importancia que pueden tener las corrientes de compuerta de  $Na^{+}$  en estos registros se aplicaron PAs con un valor máximo de potencial de  $-30$  mV que está próximo al umbral de la activación de la  $ICa^{2+}$  (trazado naranja). La resultante de la diferencia entre estos trazados es la corriente de  $Ca^{2+}$  (trazado verde).

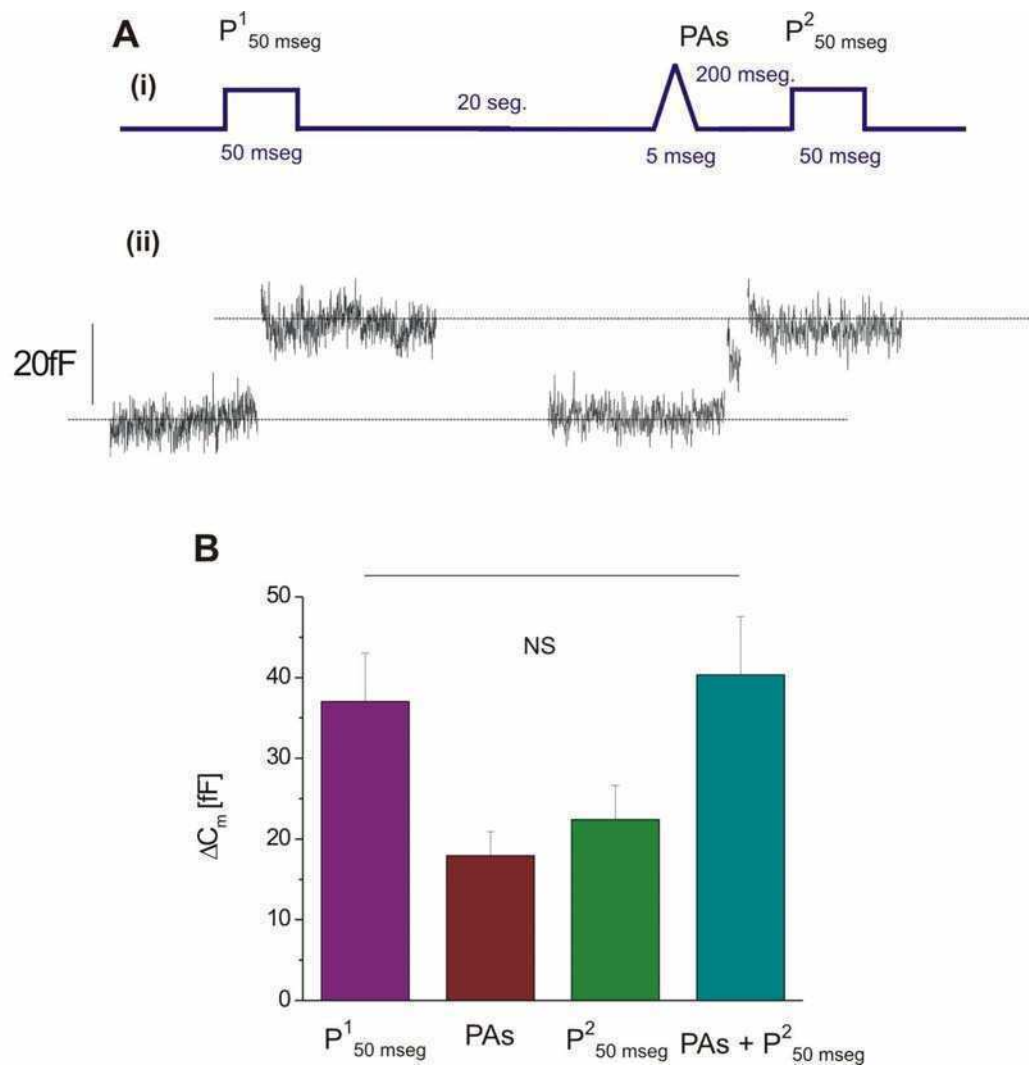


**Figura 5.15** - Acoplamiento de la exocitosis con la  $I_{Ca^{2+}}$  y participación de los distintos subtipos de canales de calcio en la liberación del PPA. (A) (i) Este esquema muestra la forma del PAs aplicado. En (ii) se muestran ejemplos representativos de trazados de capacitancia en respuesta a un PAs en condición control y con la aplicación de los bloqueantes de los canales L (Nitre) y de los P/Q (Aga). (B)(i) El gráfico de barras representa los promedios de la exocitosis inducida por aplicación de un PAs en células controles ( $n=34$ ), con Nitro ( $n=26$ ), con Aga ( $n=16$ ) y con BAPTA ( $n=20$ ). (ii) En este gráfico las barras se representan los promedios de las densidades de corrientes inducidas por el PAs en las distintas condiciones mencionadas anteriormente.

La exocitosis que se produce por aplicación de un PAs, que denominaremos PPA (*pool* de vesículas liberadas por un potencial de acción), produjo en condiciones control un  $\Delta C_m$  de  $11 \pm 2$  fF en promedio, que representa una fracción de aproximadamente el 30% del IRP. Por tratarse supuestamente de una fracción del IRP debido a la corta duración del PAs, es esperable que las vesículas liberadas por este estímulo tengan las mismas propiedades que observamos para las vesículas de aquel *pool*. Por lo tanto se estudiaron para el PPA algunos aspectos que habían sido analizados previamente para el IRP, en particular la sensibilidad al *buffer* rápido, BAPTA, y el acoplamiento a los diferentes subtipos de canales de  $Ca^{2+}$  (Figura 5.15). El reemplazo de EGTA por BAPTA, aplicados ambos a iguales

concentraciones (0,5 mM) muestra una disminución del 55% en la exocitosis de PPA, sin cambios en la densidad de las corrientes (Figura 5.15B-ii). Esta inhibición fue similar, en forma relativa, a la que generó BAPTA sobre el IRP (51%), sugiriendo que las vesículas de ambos *pools* estarían ubicadas a una distancia similar de los canales de  $\text{Ca}^{2+}$ . En segundo lugar, se aplicaron bloqueantes específicos para los canales de calcio de tipo P/Q y L para estudiar la participación relativa de dichos canales en la liberación del PPA. Ejemplos representativos de la respuesta exocitótica celular frente a un PAs en condiciones control y con la aplicación de Nitro y Aga se muestran también en la figura 5.15A-ii. En promedio, la aplicación de Nitro produjo una inhibición significativa de la densidad de corriente, pero que no se reflejaron en cambios significativos en la exocitosis (Figura 5.15B-i). En contraste, el bloqueante del canal P/Q no llegó a disminuir significativamente la densidad de corriente (aunque mostró una clara tendencia), pero inhibió marcadamente la liberación del PPA (Figura 5.15B-i). Estos resultados demuestran que PPA tiene características de acople a canales similares a las vesículas del IRP.

Para corroborar que el PPA sea parte constituyente de IRP se realizaron experimentos con el siguiente protocolo: primero se aplicó un pulso de 50 mseg, y luego de un tiempo suficiente para que se recupere totalmente el IRP (20 seg) se aplicó un PAs y 200 mseg después otro pulso de 50 mseg (Figura 5.16A-i). La idea es que si el PPA formara parte del IRP, la exocitosis del segundo pulso de 50 mseg se debería ver reducida con respecto a lo que liberó el primer pulso de 50 mseg en una fracción similar al PPA. En figura 5.16A-ii se muestra un ejemplo representativo de la aplicación de este protocolo. En promedio, la suma de los  $\Delta C_m$  producidos por el PAs y el segundo pulso cuadrado de 50 mseg resultó en un  $\Delta C_m$  total que no difirió significativamente del generado por el primer pulso cuadrado de 50 mseg (Figura 5.16B).



**Figura 5.16** - El PPA forma parte del IRP. (A)(i) En este esquema se representa el protocolo utilizado para evaluar si el PPA es parte del IRP, este protocolo consiste en un pulso de 50 msec ( $P^1_{50 \text{ msec}}$ ) y luego de 20 seg, que es un tiempo suficiente para que se recupere el IRP, se aplicó un PAs y otro pulso de 50 msec separados por 200 msec ( $P^2_{50 \text{ msec}}$ ). En (ii) se muestra un ejemplo representativo de trazado de capacitancia en respuesta a este protocolo. (B) El gráfico de barras representan los  $\Delta C_m$  promedio de la respuesta a cada despolarización que compone el protocolo ( $n=7$ ). La suma de los  $\Delta C_m$  del PAs y el  $P^2_{50 \text{ msec}}$  no es significativamente distinta (NS) a la respuesta promedio al primer pulso de 50 msec ( $P^1_{50 \text{ msec}}$ ).

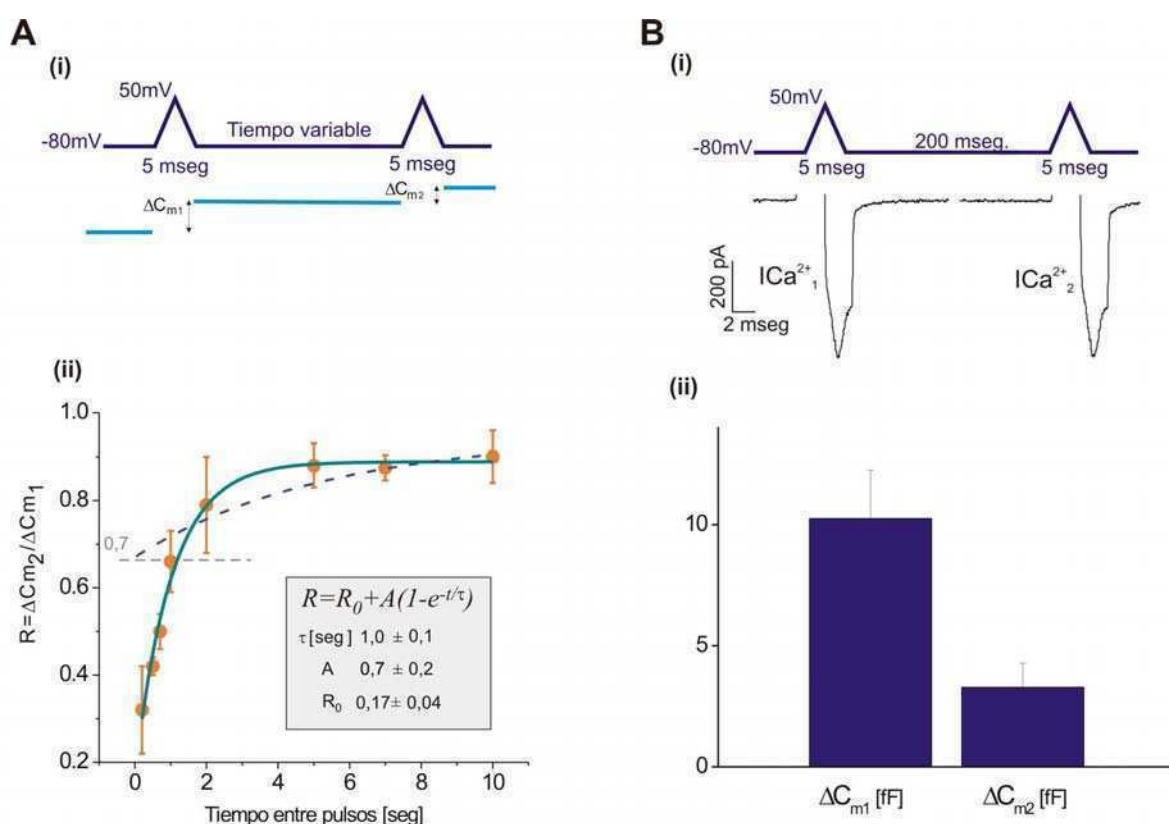
#### 5.4.5 Recuperación del PPA

Como se esperaba, las vesículas del PPA responden a las mismas características de acople con los canales P/Q que la totalidad de vesículas de IRP, y de hecho se liberan como

parte constituyente de este *pool* cuando se aplican pulsos cuadrados de 50 msec. Sin embargo esto no asegura que no pueda existir otro tipo de diferencias entre el PPA y el resto del IRP, y no sabemos a partir de los resultados presentados hasta ahora si cualquier vesícula del IRP es capaz de responder con igual probabilidad de liberación frente a un PAs. Ante esta situación nos planteamos dos escenarios. El más sencillo es que el IRP esté formado por una población homogénea de vesículas, y el PPA corresponda a la fracción de estas vesículas que se pueden liberar ante la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  producida por una estimulación tipo PAs. Una segunda hipótesis podría ser que el PPA fuera un *subpool* de vesículas con características diferenciadas del resto del IRP. Las posibles diferencias entre estas vesículas podrían estar en una mayor probabilidad de liberación o en un mayor grado de maduración para PPA. Si se cumpliera la primera hipótesis, debido a que el PPA corresponde al 30% del IRP, la aplicación de un segundo PAs (que induzca la misma entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  que el primer PAs) liberaría la misma proporción de vesículas, pero ahora respecto de lo que quedó después de la aplicación del primer PAs. Por ejemplo, si el primer PAs libera 11 fF (correspondiente al 30% del IRP), si se aplica un segundo estímulo luego de un tiempo corto que no alcance a recuperar significativamente a IRP, este liberaría la misma proporción pero ahora de lo que queda remanente en IRP (24 fF), lo que daría 7.5 fF. Resumiendo, un segundo PAs aplicado luego de un período muy corto (para evitar la recuperación de IRP) liberaría el 70% de lo que liberó primero. Además, si la hipótesis planteada fuera correcta, esperaríamos que la recuperación de la fracción deprimida de PPA siga la misma cinética de recuperación que el IRP, es decir con un tiempo característico de 7 seg. Experimentalmente, la recuperación del PPA se midió utilizando un protocolo de dos PAs separados por un tiempo variable (Figura 5.17A-i). El resultado se expresa como la relación entre la respuesta al segundo pulso ( $\Delta C_{m2}$ ) y el primero ( $\Delta C_{m1}$ ) ( $R = \Delta C_{m2} / \Delta C_{m1}$ ). Siguiendo con la hipótesis en la que el PPA sería simplemente una fracción indiferenciada del IRP, el valor mínimo de R a tiempos cortos sería de 0,7 y luego a intervalos de tiempos mayores llegaría a un valor asintótico de aproximadamente 1 con la misma cinética de recuperación del IRP. Podemos ver que la hipótesis planteada no se ajusta a los resultados experimentales por dos motivos. En primer lugar la depresión observada en PPA es mucho mayor a la esperada teóricamente si este *pool* fuera simplemente una fracción de IRP. En particular la aplicación del segundo PAs a 200 msec del primero liberó una fracción del 32% respecto de la respuesta generada por el primer estímulo. En segundo lugar se puede observar que PPA se recupera mucho más rápidamente que el IRP. La recuperación para tiempos entre 0,2 y 10 seg muestra un comportamiento creciente hasta alcanzar un valor de saturación. Aplicando un ajuste exponencial, de la misma forma que el aplicado para el IRP



(Figura 5.11A-ii) se obtiene un valor para el tiempo característico de  $1,0 \pm 0,1$  segundo y un valor de saturación ( $A+R_0$ ) de  $0,9 \pm 0,2$ . Por otro lado, la extrapolación a tiempo cero predice una depresión de PPA inmediatamente luego de finalizado el primer pulso a un valor de  $0,17 \pm 0,04$ . Es claro que el tiempo característico ajustado para PPA es varias veces más rápido que el obtenido para IRP (7 seg). Esto nos indica que PPA sería un *pool* vesicular de alta velocidad de recuperación, mucho más apto que el IRP para responder a las frecuencias fisiológicas de PA (al menos en reposo).



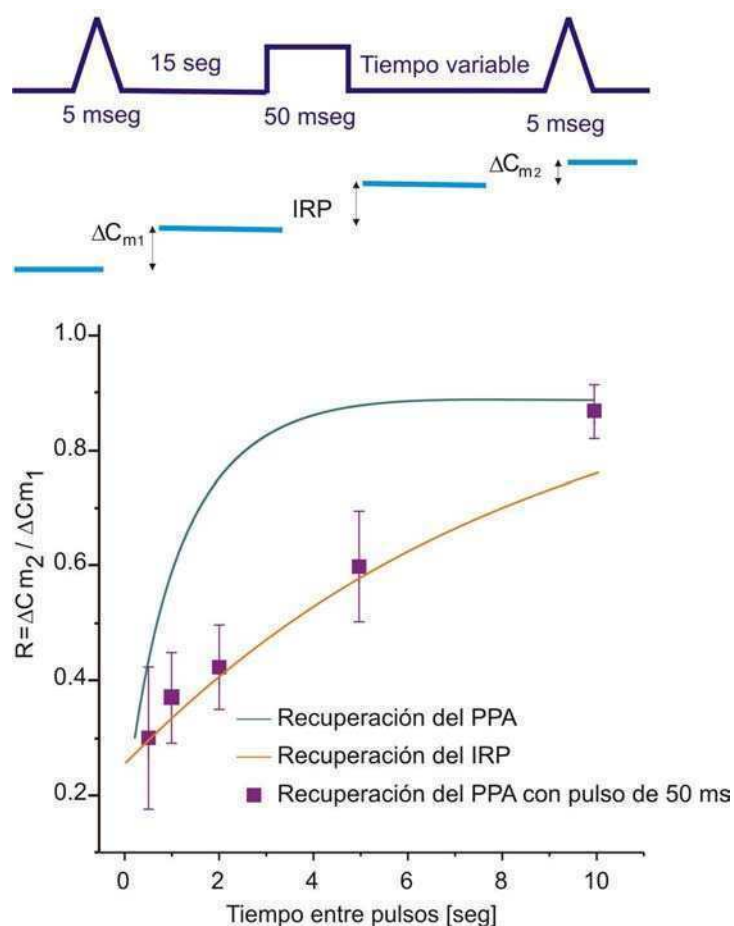
**Figura 5.17 – Recuperación del PPA.** (A) (i) La recuperación del PPA se estudió mediante un protocolo de dos PAs separados por un tiempo variable. (ii) La recuperación fue medida como la relación entre el  $\Delta C_m$  del segundo PAs ( $\Delta C_{m2}$ ) respecto al primero ( $\Delta C_{m1}$ ). El número total de mediciones en la curva fue de  $n=62$ . Se utilizó una función exponencial para ajustar los valores experimentales de recuperación (ver inserto en figura) donde  $R_0$  corresponde a recuperación a  $t=0$ ,  $A$  es la amplitud y  $\tau$  el tiempo característico. Los valores obtenidos junto con la función se muestran en el inserto de la figura. La línea punteada azul representa el resultado de una simulación en la cual se consideró que el PPA es simplemente una fracción indiferenciada del IRP. El valor mínimo de  $R$  a

tiempos cortos sería de 0,68 (representado por la línea punteada gris) y luego a intervalos de tiempos mayores se llegaría a un valor asintótico. **(B)(i)** En esta figura se muestra un ejemplo característico que ilustra como las corrientes provocadas por los PAs no muestran inactivación en el segundo pulso respecto del primero para un intervalo de 200 mseg entre ambos PAs. **(ii)** En esta figura se grafican el promedio de los  $\Delta C_m$  generados por el primer pulso ( $\Delta C_{m1}$ ) y segundo ( $\Delta C_{m2}$ ) medidos en los experimentos donde se evaluó la recuperación con un intervalo entre los PAs de 200 mseg.

Es importante resaltar que los dos PAs del par aplicado provocan  $ICa^{2+}$  similares, y por lo tanto el decaimiento en la segunda respuesta no se debe a una reducción en la entrada de  $Ca^{2+}$  sino a la depresión real del *pool* sumada a la cinética de la recuperación del mismo. Un ejemplo representativo de las  $ICa^{2+}$  generadas por dos PAs separados por 200 mseg no muestra diferencias en el pico de la corriente (Figura 5.17B-i). El promedio de las  $ICa^{2+}$  generadas con el protocolo de recuperación con un intervalo de 200 mseg no fueron significativamente diferentes ( $ICa_1^{2+} = 780 \pm 10$  pA y  $ICa_2^{2+} = 770 \pm 12$  pA,  $n=5$ ). Los cambios  $\Delta C_m$  promedio generadas por el primer ( $\Delta C_{m1}$ ) y segundo PAs ( $\Delta C_{m2}$ ) con el mismo intervalo se muestra en la figura 5.17 B-ii. Se puede observar que la exocitosis generada por el primer PAs tiene un valor en promedio similar al valor promedio control (Figura 5.15B-i). Más aun, ni para este tiempo ni para ningún intervalo medido entre PAs los promedios de  $\Delta C_{m1}$  son significativamente distintos del valor control.

En los experimentos presentados en esta sección hemos descartado la posibilidad de que PPA sea simplemente una fracción de vesículas indiferenciadas del resto de IRP. El PPA estaría en cambio, compuesto por vesículas que poseen una mayor capacidad para liberarse frente a un PAs que el resto de IRP. A su vez el PPA posee una velocidad de recuperación mucho mayor que el IRP total. Respecto a esta última característica, existen dos posibilidades: una posibilidad sería que las vesículas del PPA se recuperen velozmente a partir de vesículas que provienen desde el resto de IRP (un esquema en serie: IRP  $\leftrightarrow$  PPA), y la otra posibilidad sería que PPA se recupere por un mecanismo totalmente independiente del IRP. Un posible proceso que contemplaría esta segunda posibilidad sería que la recuperación del PPA se realice a través de un proceso de endocitosis que ocurra en el mismo sitio de la exocitosis, al estilo *kiss and run*. A fin de evaluar estas dos hipótesis, usamos el siguiente protocolo: se aplicó un primer PAs para evaluar el tamaño de PPA, y luego de un tiempo suficiente para que el PPA se recupere totalmente (15 seg) se aplica un pulso de 50 mseg a +10 mV para deprimir totalmente a IRP, y luego de un tiempo variable otro PAs (Figura 5.18A). Este protocolo experimental se basa en que si la recuperación del

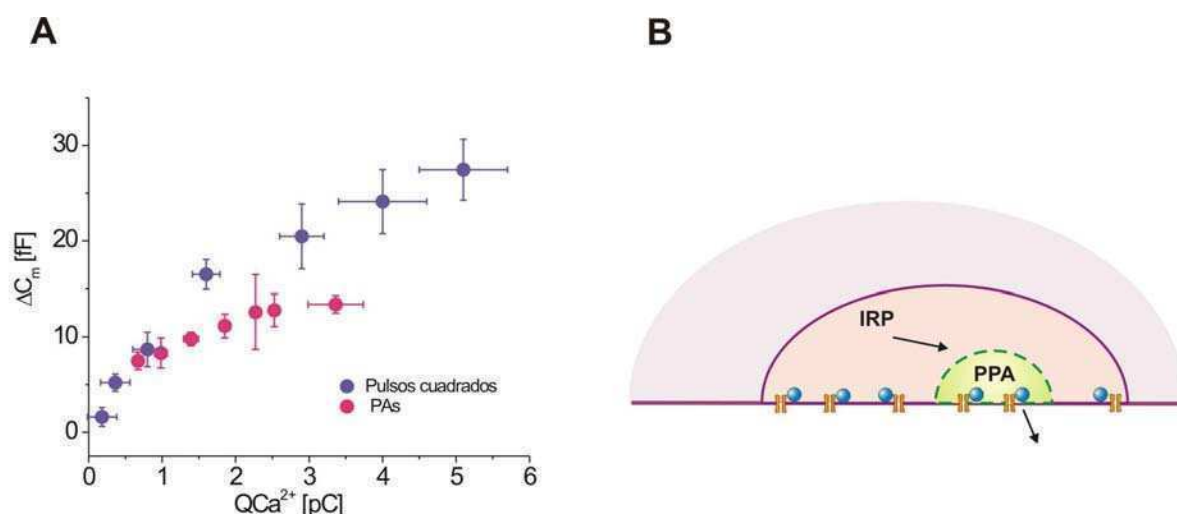
PPA fuera independiente del IRP, la liberación de este último no debería afectar la cinética de recuperación observada para el PPA (Figura 5.17A-ii). A su vez, si la recuperación de PPA se realizara a partir de vesículas de IRP, en un esquema en serie, al deprimir totalmente el IRP dicha recuperación se aproximaría a los tiempos de recuperación de este *pool* (7 veces más lenta que la de PPA), ya que esta sería la velocidad limitante del proceso.



**Figura 5.18-** Dependencia de la recuperación del PPA con el IRP. (A) Para estudiar la cinética de recuperación del PPA luego de la depresión total de IRP se utilizó un protocolo que consta de un PAs y luego de 15 seg, que es un tiempo suficiente para que PPA se recupere, un pulso de 50 msec que libere el IRP, y finalmente un segundo PAs luego de un tiempo variable. (B) En esta figura se grafica el valor de  $R = \Delta C_{m2} / \Delta C_{m1}$ , (donde  $\Delta C_{m1}$  y  $\Delta C_{m2}$  son los cambios de capacitancia generados por los PAs) generado por el protocolo descrito en A para intervalos entre 0,5 y 10 seg (cuadrados violetas). El número total de experimentos en toda la curva es de  $n=85$ . En el mismo gráfico se superponen los ajustes de las curvas en las que se midió la recuperación del PPA (línea naranja, tomada de la figura 5.17A-ii) y la recuperación del IRP (línea verde, tomada de la figura 5.11A-ii).

La recuperación de PPA (expresado por el cociente R:  $\Delta C_m$  inducido por el segundo PAs dividido por  $\Delta C_m$  inducido por el primer PAs) en función del intervalo interpuesto entre el pulso de 50 mseg y el segundo PAs se muestran la figura 5.18A (cuadrados violetas). El resultado de estos experimentos mostró que la previa liberación de IRP hace que el PPA se recupere con una cinética similar a la del IRP (comparar los puntos violetas con la curva naranja, que representa la recuperación del IRP, tomada de la figura 5.11A-ii), la cual es mucho más lenta que la observada previamente para PPA (curva verde, obtenida de la figura 5.17A-ii). Estos resultados indicarían que el PPA se recuperaría por un mecanismo dependiente del reclutamiento de vesículas desde el IRP. Nuevamente es importante aclarar que la exocitosis del primer PAs provoca una exocitosis similar al valor control ( $9 \pm 1$  fF,  $n=85$ ).

Los resultados de los últimos dos capítulos son consistentes con un esquema en el cual un PAs aislado actuaría solamente sobre un grupo particular de vesículas, que son las que forman el PPA. El resto del IRP sería insensible a estimulaciones de tan corta duración. A su vez el PPA, cuando es deprimido, sería recuperado por vesículas provenientes del resto de IRP. Este conjunto de resultados sugieren que las vesículas de PPA son en alguna manera más aptas para liberarse que las del resto del IRP, pero a su vez un pulso despolarizante de 50 mseg sería suficiente para liberar todo el IRP incluyendo el PPA. Para analizar más en detalle el efecto de la entrada de  $Ca^{2+}$  sobre la exocitosis en estas dos condiciones experimentales, en el gráfico de la figura 5.19A se grafican los  $\Delta C_m$  en función de la  $QCa^{2+}$ , para pulsos despolarizantes cuadrados de duraciones menores e iguales a 50 mseg y para PAs. A partir de estas curvas se observó que mientras que la curva correspondiente al PPA se satura a  $QCa^{2+}$  mayores a 2 pC, la que corresponde al IRP continúa creciendo en forma marcada. Es posible que despolarizaciones de una duración relativamente larga favorezcan el pasaje de vesículas de IRP a PPA en forma  $Ca^{2+}$  dependiente (Figura 5.19B). Esto estaría favorecido por la localización de las vesículas del IRP, que estando próximas a los canales de  $Ca^{2+}$  estarían expuestas a altas concentraciones de este catión. Esto predeciría que cuando se aplican PAs pareados, aplicando el segundo a un tiempo muy corto respecto al primero (menor a los intervalos mostrados en la figura 5.17A-ii) debería existir un intervalo en el cual el PPA aumenta respecto a lo observado por extrapolación en la figura 5.17A-ii. De hecho cuando se aplicó el segundo PAs a sólo 100 mseg del primero, R tomó un valor de  $0,73 \pm 0,06$ , marcadamente mayor que lo predicho por la extrapolación (0,18). Además la aplicación del *buffer* rápido BAPTA disminuyó significativamente el valor de R medido con un intervalo de 100 seg a  $0,43 \pm 0,08$  ( $p<0,05$ ), indicando que este valor es dependiente de una señal localizada de  $Ca^{2+}$ .

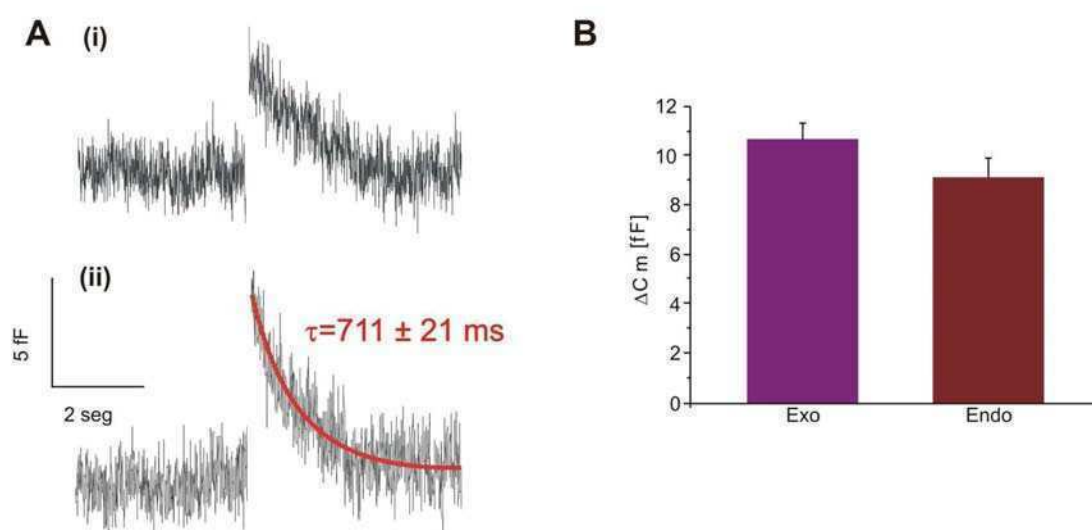


**Figura 5.19** – Comparación de las curvas obtenidas para los  $\Delta C_m$  en función de la  $QCa^{2+}$ , entre pulsos cuadrados y PAs. (A) Los círculos representan los valores de cambio de capacitancia generados por pulsos cuadrados de duraciones menores a 50 mseg (azules) y los PAs (rosas) en función de las  $QCa^{2+}$ . Las líneas punteadas representan los resultados obtenidos a partir de simulaciones computacionales en las cuales variando el valor de la constante de traspaso de vesículas desde el IRP al PPA. (B) En este gráfico se esquematiza el modelo en el que se basaron las simulaciones que reproducen los valores experimentales en (A). El PPA forma parte del IRP y a su vez estos pools se relacionarían a través de una reacción.

#### 5.4.6 Endocitosis frente a un PAs

Si bien los experimentos de la sección anterior indican que PPA se recuperaría por translocación de vesículas desde IRP, nos preguntamos si la exocitosis de PPA tiene o no un proceso endocítico acoplado. Cuando se fusiona una vesícula a la membrana plasmática se genera en consecuencia un aumento de superficie de esta última, que es equivalente a la superficie vesicular y que se registra como un  $\Delta C_m$ . Dicho aumento de superficie debe ser recuperado por endocitosis. La endocitosis puede llevarse a cabo inmediatamente, de modo altamente acoplado a la exocitosis, o muy posteriormente, en forma desacoplada.

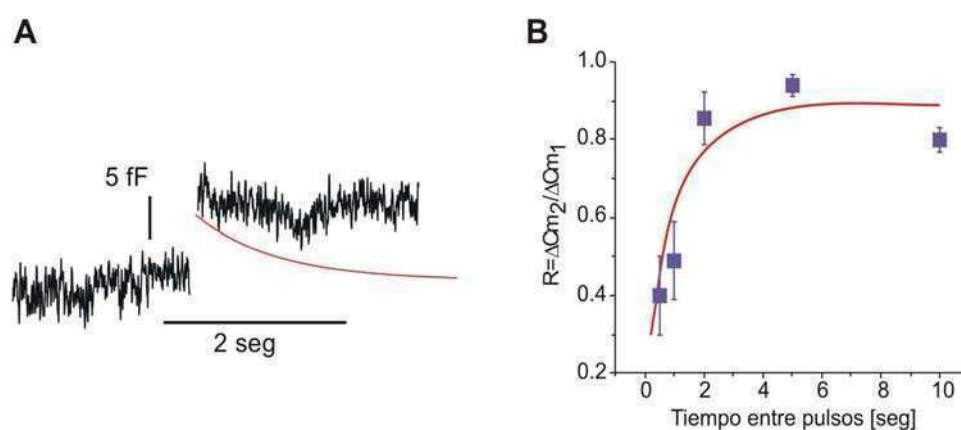
Frente a una despolarización que genere exocitosis, la presencia de endocitosis se observa como una disminución de la capacitancia celular. En nuestros experimentos se observó que la aplicación de un PAs produce, luego del aumento en la capacitancia celular, una clara disminución en esta misma variable que llega a compensar la exocitosis previa. En la figura 5.20A-i se muestra un ejemplo representativo de un trazado de capacitancia al aplicar un PAs que incluye al proceso endocítico. El promedio punto a punto de los trazados de capacitancia muestran un comportamiento similar (Figura 5.20A-ii). De hecho, los valores promedio muestran que la magnitud de esta endocitosis no se diferencia de la exocitosis previa (Figura 5.20B). La cinética de decaimiento de la capacitancia se midió utilizando un ajuste exponencial en cada experimento. El ajuste se aplicó desde 100 msec después de terminado el estímulo (para evitar el  $\Delta C_m$  producido por las corrientes de compuerta de los canales de  $\text{Na}^+$ ) (Moser y Neher, 1997a) hasta aproximadamente 5 seg después. El tiempo característico de decaimiento promedio de este proceso fue de  $\tau_e = 711 \pm 21$  msec, llegando en promedio a compensar totalmente el valor de la exocitosis previa a los 4 seg de terminado el pulso (Figura 5.20B). Estos resultados enmarcan a esta endocitosis en un tipo de endocitosis rápida compensatoria (Engisch y Nowycky, 1998).



**Figura 5.20** - Endocitosis frente a un PAs. (A) (i) Ejemplo representativo del  $\Delta C_m$  en respuesta a un PAs, en una escala temporal que permite apreciar la endocitosis que se desarrolla posteriormente a la exocitosis. (ii) Promedio de los  $\Delta C_m$  en respuesta a un PAs ( $n=28$ ). La caída en la capacitancia,

representativa de la endocitosis, fue ajustada a una función exponencial. El ajuste está representado por la línea roja superpuesta al trazado experimental. **(B)** El gráfico de barras representa los valores promedios de exocitosis y endocitosis, esta última medida como la diferencia entre los valores de capacitancia a 100 mseg después de terminada la despolarización y a los 4 seg, cuando la caída se completó totalmente. La comparación de ambos valores muestra que la endocitosis no presenta diferencias significativas en comparación con la exocitosis producida por un PAs.

El tiempo característico medido para el proceso de endocitosis es coherente con el tiempo de recuperación del PPA. Para analizar la posibilidad de que esta endocitosis pueda estar relacionada con la recuperación de vesículas, se utilizaron tratamientos que sabemos que afectan a la endocitosis rápida, y se evaluaron sus efectos sobre la endocitosis generada por un PAs y sobre la recuperación del PPA. Es esperable que estos tratamientos generen una disminución en la caída de capacitancia después de la exocitosis, pero podrían afectar o no a la recuperación. Existen evidencias que demuestran que la endocitosis rápida es activada preferentemente por una entrada de calcio desde los canales de tipo L (Rosa y col., 2007). El bloqueante del canal L, Nitre, produjo una marcada inhibición de la endocitosis generada luego de la aplicación de un PAs en comparación con la condición control (Figura 5.21A), mientras que la recuperación de PPA no fue afectada por este bloqueante (Figura 5.21B).

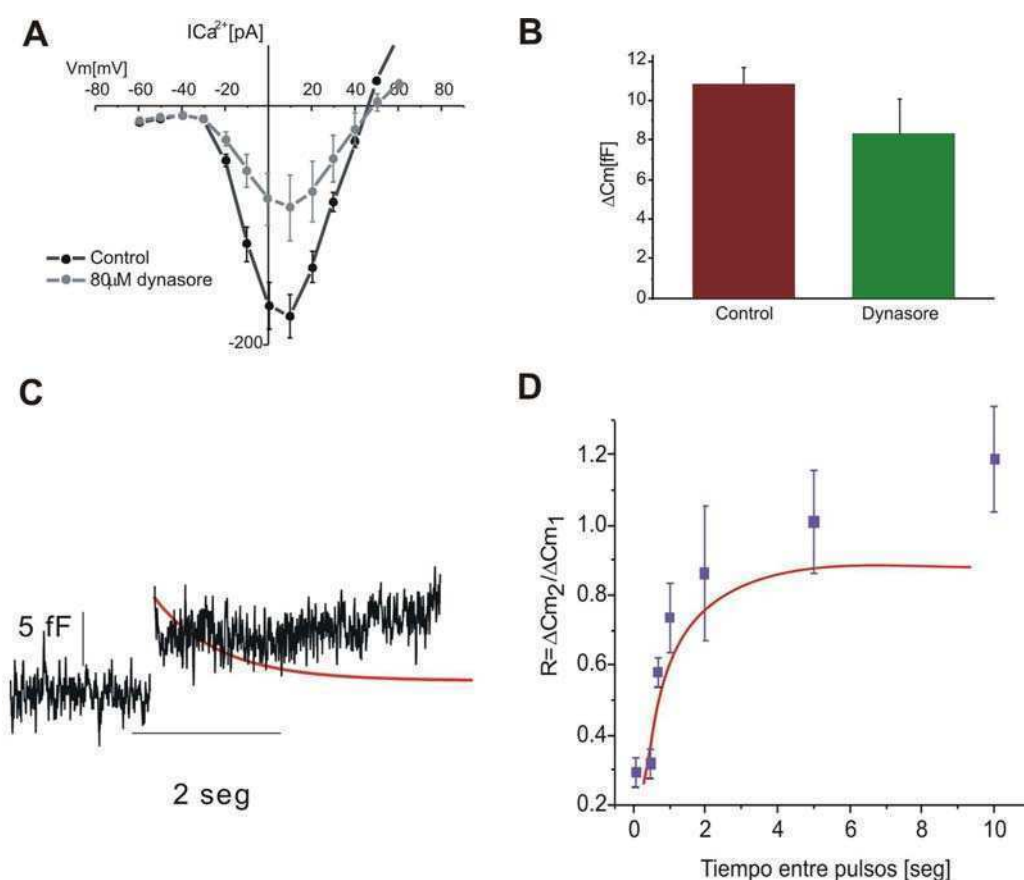


**Figura 5.21-** EL bloqueo de los canales L inhibe a la endocitosis rápida **(A)** Promedio de los  $\Delta C_m$  producidos por un PAs en presencia de Nitre (10  $\mu M$ ) ( $n=28$ ). Se observa que El bloqueo de los canales L genera una clara inhibición en la endocitosis. La línea roja muestra el ajuste obtenido para el promedio de los experimentos controles (Figura 5.20A-ii) para su comparación. **(B)** En esta figura se comparan la recuperación del PPA, en función del tiempo entre PAs en presencia de Nitre (cuadrados azules) con la condición control, obtenida en la figura 5.17A-ii (línea roja). La

recuperación fue medida utilizando el protocolo de dos PAs separados por un tiempo variable (ver figura 5.17A-i), no muestra diferencias con lo observado en condición control (línea continua roja). El número de experimentos independientes en toda la curva es  $n=45$ .

Existen evidencias que la endocitosis rápida puede también ser inhibida por el fármaco dynasore (Tsai y col., 2009), que actúa como un inhibidor no competitivo de la dinamina. La dinamina es una GTPasa que se polimeriza ensamblándose como un collar alrededor del cuello de los *budding pits*. Cuando la dinamina es desfosforilizada cambia la configuración de este collar a un estado más apretado, cerrando el poro fisión y ayudando a completar la endocitosis. El dynasore mantiene a la dinamina en su configuración relajada, y por lo tanto esta droga es un potente inhibidor de la endocitosis (Danino y col., 2004). Este compuesto tiene como desventaja que produce una inhibición de las  $ICa^{2+}$  (Tsai y col., 2009), y por otro lado la inhibición de la endocitosis constitutiva provoca la aparición de una exocitosis basal neta, por lo que se debe trabajar generalmente sobre una pendiente positiva en la medición de la capacitancia celular (Tsai y col., 2009). La aplicación de dynasore a una concentración de 80  $\mu M$  produjo una inhibición del 50% en las  $ICa^{2+}$  en el pico de la curva IV ( $p<0,05$ ) (Figura 5.22A), pero sin reducir significativamente el tamaño promedio del PPA (Figura 5.22B). Este compuesto inhibió casi totalmente a la endocitosis generada por un PAs, lo que se puede observar comparando el trazado experimental de capacitancia en presencia de dynasore con el ajuste en condición control, representado por la línea roja (Figura 5.22C). Sin embargo, este fármaco no inhibió en lo más mínimo la recuperación del PPA (Figura 5.22D). En particular, el parámetro R (utilizado para cuantificar la recuperación del PPA) en presencia de dynasore mostró valores mayores que la curva control a tiempos  $\geq 5$  segundos. Este efecto podría relacionarse con el desbalance que genera el dynasore al inhibir la endocitosis constitutiva (Tsai y col., 2009), que en condiciones controles se desarrolla en forma simultánea con una exocitosis constitutiva, de forma de mantener la cantidad de membrana constante. En consecuencia, el aumento sostenido que se observa luego de los 5 seg podría deberse a un proceso de exocitosis constitutiva.





**Figura 5.22** - Efecto de la aplicación del inhibidor de la endocitosis rápida, dynasore (80  $\mu$ M.). (A) En esta figura se grafican las curvas IV promedios en condiciones control ( $n=5$ ) y con dynasore ( $n=4$ ). Las curvas IV se generaron por pulsos cuadrados de 200 msec de duración (desde el potencial de mantenimiento de -80 mV hasta valores de  $V_m$  entre -60 mV y +60 mV). Dynasore provocó una clara inhibición en las  $I_{Ca^{2+}}$  generadas. En particular para despolarizaciones a 0 mV y 10 mV LA disminución fue del ~50% ( $p<0,05$ ) (B) Las barras representan los valores promedios de  $\Delta C_m$  en condición producidos por el PAs control ( $n=34$ ) y con dynasore ( $n=30$ ) generados por un PAs. El  $\Delta C_m$  con dynasore es levemente inferior aunque no significativamente a la obtenida en condición control. (C) En este gráfico se observa el promedio de los trazados de capacitancia en respuesta a un PAs con dynasore, mientras que la línea roja es el ajuste de los experimentos controles presentado en la figura 5.20A-ii. (D) En este gráfico se muestra la curva de recuperación del PPA (medida como en la figura 5.17A-ii). En presencia de dynasore. Para su comparación, el ajuste de la curva control de la figura 5.17A-ii se superpone a los valores experimentales.

### 5.4.7 Discusión

En esta sección de resultados se analizaron varios puntos con el fin de contribuir al entendimiento del posible rango de frecuencias de acción del IRP.

El primer paso fue estudiar la recuperación de IRP. Esta recuperación, evaluada como la relación  $R$  (ver sección 5.4.1), fue ajustada por una función exponencial simple con un tiempo característico de recuperación de 7 seg. La recuperación del IRP fue medida por otros autores pero utilizando distintos protocolos. Moser y Neher, (1997a) utilizaron dos pulsos de 20 msec separados por un tiempo variable y obtuvieron un tiempo característico de ~10 seg. Este valor es similar a nuestro valor, y a su vez similar al tiempo característico de recuperación del RRP, el cual se estimó entre 3-15 seg (Moser y Neher, 1997a; Voets y col., 1999; Dinkelacker y col., 2000).

Es sabido que el tamaño del IRP, y su recuperación, pueden ser regulados por diversos factores. Entre estos posibles factores está el  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico. En esta tesis se observó que, una concentración de 500 nM aumentaba significativamente el tamaño de este *pool* en comparación con 200 nM. Concentraciones ya mayores disminuyeron el tamaño de IRP, probablemente debido a que estimulan de manera constante a la exocitosis  $\text{Ca}^{2+}$  dependiente (Sorensen y col., 2004). La regulación de los tamaños de IRP y de RRP por el  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico ya había sido observada en las células cromafines bovinas (Marengo, 2005; Smith y col., 1998). El aumento en el tamaño de estos *pools* se ha relacionado generalmente con la traslocación de vesículas desde los *pools* menos maduros (río arriba) en forma  $\text{Ca}^{2+}$  dependiente (Smith y col., 1998; Marengo y col., 2005).

La extrapolación de la variable  $R$ , que representa la recuperación del IRP, a un tiempo entre pulsos igual a cero nos dio un  $R_0$  de aproximadamente 0,2. Este valor indica que una fracción del IRP se recupera casi inmediatamente. Además, una concentración del calcio citosólico libre de 500 nM aumenta este valor a 0,5. Estos resultados sugieren que la recuperación del IRP sería bifásica. Una primera fase que se mantiene unos pocos seg después de la despolarización y es dependiente de  $\text{Ca}^{2+}$ , y otra más lenta con un tiempo característico de 7 seg que sería independiente  $\text{Ca}^{2+}$ . Un valor de  $R_0$  mayor a cero fue observado en otros trabajos en los que se estudió la recuperación del RRP (Moser y Neher, 1997a; Smith y col., 1998). Además estos autores observaron que el valor de  $R_0$  aumentó con el  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico desde 0,2 (para valores de  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico entre 0 y 450 nM) a 0,4 (para valores de  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico entre 450 y 1200 nM) (Smith y col., 1998). En este último trabajo, se propuso la existencia de un proceso de recuperación transitorio dependiente de

PKC que se activaría por la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  transitoria local que se mantiene después de una despolarización (Smith y col., 1998). Es de resaltar que en algunas mediciones realizadas a tiempos de recuperación menores de 2 seg nosotros observamos también evidencias de este proceso transitorio (el valor de R llegó a tomar valores de  $\sim 0,7$ ).

Los tiempos de recuperación obtenidos para IRP en nuestras condiciones experimentales no son compatibles con una participación sostenida de este *pool* vesicular a frecuencias fisiológicas, ni siquiera basales (0,5 Hz). Un tiempo característico de 7 seg implicaría una recuperación de un 95% a los 21 seg, lo cual podría sostener una exocitosis constante a una frecuencia  $< 0,05$  Hz. Sin embargo, es posible que la observada dependencia de la fase rápida de recuperación con el  $\text{Ca}^{2+}$  contribuya a que este *pool* pueda recuperarse más velozmente en condiciones fisiológicas a medida que la frecuencia de disparo aumenta.

Además de la regulación por  $\text{Ca}^{2+}$ , es esperable que a temperaturas fisiológicas el tiempo de recuperación del IRP se acorte. En un trabajo de Dinkelacker y col., (2000) se observó que a una temperatura de  $37^{\circ}\text{C}$ , tanto el tamaño como la velocidad de recuperación del RRP estaban aumentados. El  $Q_{10}$  para este proceso de recuperación resultó ser de 2,3, lo que corresponde a una aceleración de la recuperación por un factor mayor a 3 cuando la temperatura aumenta desde  $22$  a  $37^{\circ}\text{C}$ . Además, los autores observaron que la recuperación transitoria es más prominente a  $37^{\circ}\text{C}$  que a  $32^{\circ}\text{C}$ , llegando a generar un sobrerellenado transitorio. Sería esperable que el IRP, por estar formado por vesículas en el mismo estadio madurativo que RRP, también este regulado por la temperatura. Este es un aspecto que deberá ser estudiado en el futuro.

Se debe tener en cuenta que la actividad secretoria de las células cromafines en una situación fisiológica se induce a través de la llegada de trenes de PA, que producen la consecuente despolarización de la membrana y entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  que genera la exocitosis. Nuestros resultados mostraron que la aplicación de una despolarización que simula un potencial de acción genera la liberación de  $\sim 8$  vesículas. Como se esperaba, este *pool* de vesículas, que denominamos PPA, tiene las mismas características de acople con los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  tipo P/Q que la totalidad del IRP. Las evidencias que apoyan esta conclusión son; (1) la sensibilidad a BAPTA del PPA que demuestra la cercanía entre canales y vesículas (2) El efecto inhibitorio de Aga sobre el PPA y la insensibilidad a Nitro. (3) la suma de los  $\Delta C_m$  generados al aplicar consecutivamente un PAs y un pulso de 50 mseg, es igual al valor control generado por un pulso anterior de 50 mseg, lo que indicaría que el PPA forma parte del IRP.

Se plantean dos posibilidades en cuanto a la naturaleza de PPA. Una posibilidad es que el IRP esté formado por una población homogénea de vesículas, y el PPA correspondiera a la fracción de estas vesículas que se pueden liberar ante la entrada de calcio producida por una estimulación tipo PAs. La otra posibilidad plantea que el PPA sería un *subpool*, cuyas vesículas tienen características diferenciadas del resto del IRP. Bajo la primera hipótesis, debido a que el PPA estaría formado por vesículas idénticas al resto de IRP, el valor de R a tiempo cero sería 0,7 y a tiempos mayores esperaríamos que la recuperación de la fracción deprimida de PPA siga la misma cinética de recuperación que el IRP, es decir con un tiempo característico de 7 seg (ver figura 5.17A-ii). Sin embargo, los valores experimentales de la recuperación de PPA no se ajustan a esta posibilidad, ya que por un lado la recuperación del PPA a tiempos cortos fue claramente menor que el 0,7 que establece el modelo teórico y además la recuperación presentó un tiempo característico de 1 segundo (7 veces más rápido que el IRP). Estos resultados experimentales descartaron la posibilidad de que PPA sea simplemente una fracción de vesículas indiferenciadas del resto de IRP. El PPA por lo tanto se trataría de un *pool* de vesículas con mayor capacidad para liberarse frente a un PAs y con una velocidad mayor de recuperación que el resto de IRP.

A partir de las conclusiones del punto anterior se plantearon dos posibles escenarios para la recuperación del PPA. Una posibilidad sería que las vesículas del PPA se recuperen a partir del reclutamiento de vesículas desde el resto de IRP, y otra que se recuperen por un proceso totalmente independiente del IRP, por ejemplo una endocitosis del tipo *kiss and run*. Nuestros resultados experimentales (ver figura 5.18B) son coherentes con la primera hipótesis, indicando que este *pool* es abastecido por las vesículas del resto del IRP. Estos resultados son consistentes con un esquema en el cual frente a un PAs, la liberación se produce solamente a partir de vesículas que forman el PPA, y que este *pool* sería recuperado por vesículas provenientes del resto de IRP. Por otro lado, la segunda hipótesis exige la presencia de un proceso endocítico rápido luego de la exocitosis de PPA. Este proceso fue consistentemente observado en nuestros experimentos (ver figuras 5.20A). El proceso de endocitosis rápida compensatoria frente a un PAs ha sido observado también por otros autores (Chan y Smith, 2001; Chan y col., 2003). Estos autores lo asociaron con un proceso de *kiss and run*, que se activaría a bajas frecuencias de estimulación (Fulop y Smith, 2003). Sin embargo, nuestros resultados experimentales mostraron que la aplicación de fármacos que inhibieron marcadamente la endocitosis rápida luego de un PAs, no modificaron en cambio la recuperación del PPA. Además, si las pocas vesículas que se liberan ante un PAs fueran recuperadas por *kiss and run*, sería esperable observar disminuciones en saltos discretos en la capacitancia de la membrana, y no un trazado

continúo como el que se observa experimentalmente. Estos resultados en su conjunto nos indican que la endocitosis rápida que se activa luego de la exocitosis de PPA no estaría involucrada en la recuperación de dicho *pool*.

Una posibilidad que explicaría las diferencias observadas en las propiedades de liberación de PPA e IRP sería que las vesículas de estos dos *pool/s* difieran en la distancia al canal de  $\text{Ca}^{2+}$ . Esta posibilidad es poco probable ya que se observó que el efecto inhibitorio de BAPTA sobre el PPA es en proporción similar a su efecto sobre el IRP. Como se explicó en capítulos anteriores, la eficiencia de la inhibición de la exocitosis por BAPTA está muy relacionada con la distancia entre el canal y las vesículas (Neher, 1998). Por lo tanto estos resultados nos hablarían de una distancia similar. Otra posibilidad sería que las vesículas del PPA tengan un sensor de  $\text{Ca}^{2+}$  distinto al resto del IRP. Si bien se ha propuesto que el sensor de  $\text{Ca}^{2+}$  fundamental para la exocitosis en las células cromafines es la sinaptotagmina 1 (Voets y col., 2001), existen evidencias de la participación de otros miembros de la familia de las sinaptotagminas, como la sinaptotagmina 2 (Nagy y col., 2006) y la sinaptotagmina 7 (Schonn y col., 2008). Sin embargo en ratones KO de sinaptotagmina 1 se ha observado la pérdida total de la liberación del RRP (Voets y col., 2001b). Además, el rescate de la sinaptotagmina 1 en los ratones KO para esta proteína por la sobreexpresión de sinaptotagmina2 (Nagy y col., 2006) y de la sinaptotagmina 7 (Schonn y col., 2008) recupera la liberación pero con una cinética mucho más lenta (Nagy y col., 2006). Si bien estas observaciones no apoyan la hipótesis planteada, no tenemos evidencias experimentales que puedan descartarla. Una tercera posibilidad es que las vesículas del IRP estuvieran conformadas por dos grupos de vesículas con diferentes estados de maduración para su liberación. El estadio final sería alcanzado frente a una señal de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular sostenida. Bajo esta hipótesis, cuando los pulsos son cortos, como un PAs, este proceso de transferencia de vesículas desde el IRP al PPA no sería muy eficiente, mientras que para pulsos de mayor duración se favorecería mucho dicha transferencia, provocando la liberación de todas las vesículas del IRP (ver figura 5.19B).

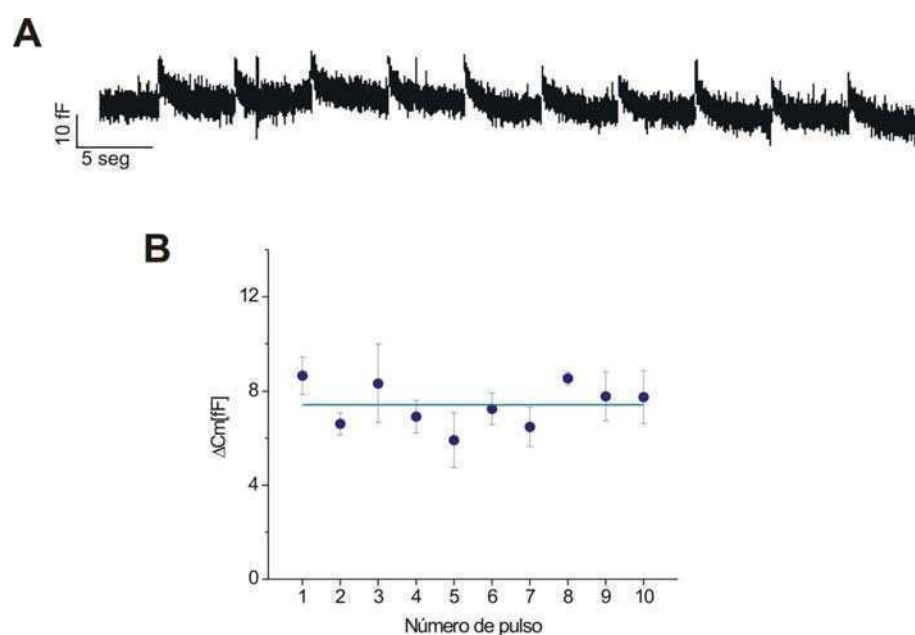
## ***5.5 Trenes de potenciales de acción***

Hasta este punto estudiamos la recuperación del PPA utilizando un par de PAs, lo que nos dio información sobre la cinética y el mecanismo de recuperación. El siguiente paso es poner a prueba las características de reciclado y de la endocitosis observada frente a trenes de PAs a distintas frecuencias. Empezaremos por describir los resultados de los trenes a

bajas frecuencias, con valores entre 0,2 y 0,5 Hz y luego se caracterizará la respuesta a una frecuencia de 10 Hz.

### ***5.5.1 Trenes a baja frecuencia***

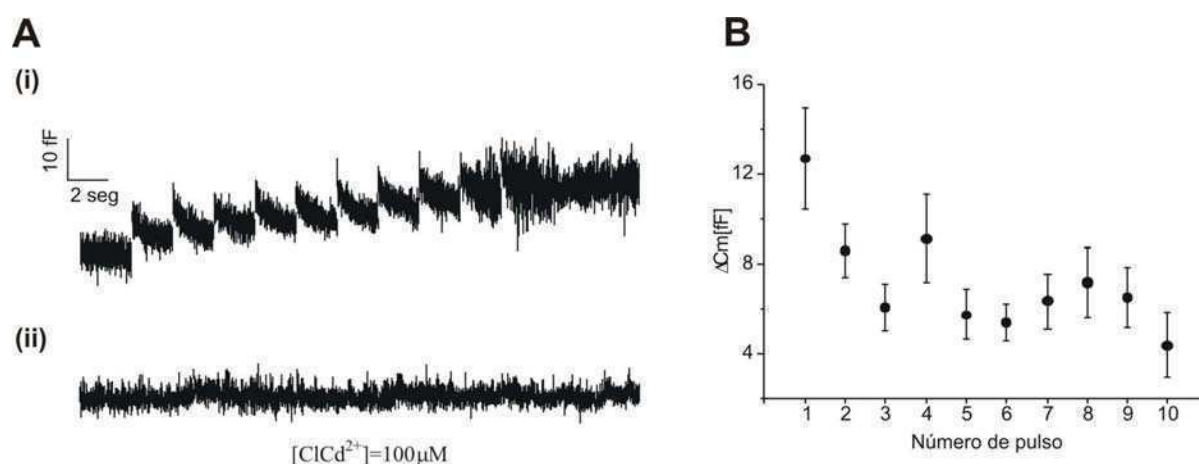
Los trenes de PAs aplicados a 0,2 Hz generan un aumento de capacitancia en cada pulso, asociado a la exocitosis, que luego disminuye (gracias a la endocitosis ya descrita) hasta llegar al valor basal antes que llegue el siguiente estímulo (Figura 5.23A). Es importante resaltar que la exocitosis generada en cada pulso se mantuvo constante durante los 10 pulsos (Figura 5.23B), evidenciando una recuperación completa del PPA durante los intervalos entre PAs, que a esta frecuencia fueron de 5 seg. En la sección anterior se mostró cómo los cambios de superficie celular provocados por la exocitosis asociada a PPA son totalmente compensados por una endocitosis rápida que se desarrolla con un tiempo característico de aproximadamente 0,7 seg. A partir de dichas evidencias experimentales, se esperaba que frente a un tren de PAs a una frecuencia de 0,2 Hz, que corresponde a una separación entre pulsos de siete veces el tiempo característico de la endocitosis, la capacitancia de la membrana basal permanezca constante, es decir que no haya un aumento acumulativo al final del tren. De acuerdo con dicha expectativa, la respuesta promedio generada por trenes de 10 PAs a 0,2 Hz mostró que todos los  $\Delta C_m$  asociados a cada pulso fueron seguidos por decaimientos que compensaron dichos aumentos, de forma que al final del tren no se observó un aumento efectivo (Figura 5.23A). El decaimiento en la capacitancia en cada pulso del tren fue ajustado con una función exponencial. El tiempo característico promediado, tomando todos los pulsos de los trenes, fue de  $660 \pm 51$  mseg, que no difiere significativamente del observado para un PAs único.



**Figura 5.23** - Respuesta a trenes de PAs a 0,2 Hz (A) El trazado muestra el promedio de los trazados de capacitancia obtenidos ( $n=6$ ) frente a trenes de PAs (0,2 Hz). Todas las despolarizaciones contenidas en el tren indujeron  $\Delta C_m$  sincrónicos con los estímulos seguidos por decaimientos que compensan completamente los cambios de superficie de membrana gracias a un proceso endocitótico. (B) La exocitosis sincrónica promedio en función del número de pulso muestra que la respuesta permanece constante durante los pulsos sucesivos. El valor promedio de la exocitosis fue de  $7.4 \pm 0,3$  fF ( $n=60$ ), el cual se encuentra indicado en el gráfico por la línea celeste.

Seguidamente se aumentó la frecuencia de los trenes, para analizar su efecto en el proceso exocitótico-endocitótico en su conjunto. La aplicación de trenes de PAs separados por 2 seg (0,5Hz), que corresponde a 2 veces el tiempo característico de recuperación del PPA, produjo una respuesta exocitótica que, en este caso, la endocitosis no terminó de compensar completamente. La falta de compensación produjo un  $\Delta C_m$  neto total al final del tren de  $12 \pm 4$  fF (Figura 5.24A-i). Es posible que parte de los  $\Delta C_m$  sincrónicos observados durante la aplicación de PAs aislados o en tren se deban a efectos transitorios producidos por las corrientes de compuerta de los canales de  $\text{Na}^+$  (Chan y Smith, 2003). Para descartar esta posibilidad se repitió el mismo protocolo descrito previamente, pero ahora usando un inhibidor de canales de  $\text{Ca}^{2+}$ , como es el  $\text{Cd}^{2+}$  (100  $\mu\text{M}$ ). En estas condiciones, un proceso independiente de la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$ , como son dichas corrientes de compuerta, deberían permanecer en la respuesta. Como se puede ver, en un promedio de 4 experimentos independientes, no hubo cambios evidentes de capacitancia cuando los canales de  $\text{Ca}^{2+}$

fueron bloqueados con  $\text{Cd}^{2+}$  (Figura 5.24A-ii). Esto reafirma que los  $\Delta C_m$  producidos por estos trenes se deben a la exocitosis producida por los PAs y a la endocitosis asociada. El análisis de la exocitosis sincrónica inducida por cada pulso en trenes de 0,5 Hz muestra un decaimiento progresivo en esta respuesta a medida que pasan los pulsos (Figura 5.24B). Esto probablemente se debe a que la recuperación de PPA no llega a completarse en los 2 seg que hay entre pulsos consecutivos a esta frecuencia.



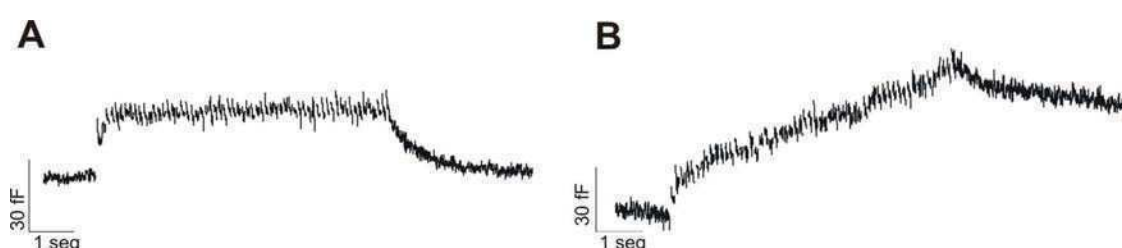
**Figura 5.24** – Exocitosis generada frente a trenes de PAs a 0,5 Hz. (A) (i) Trazado de capacitancia promedio generado por un tren de 10 PAs ( $n=13$ ). En este trazado se observa un  $\Delta C_m$  sincrónico, seguido por una endocitosis que en este caso no llega a compensar totalmente la exocitosis. (ii) Trazado de capacitancia obtenido frente al mismo tren anterior en presencia del bloqueante de canales de  $\text{Ca}^{2+}$   $\text{Cd}^{2+}$  ( $100 \mu\text{M}$ ). Este bloqueante inhibe la respuesta exocitótica demostrando la dependencia de esta respuesta con el  $\text{Ca}^{2+}$ . (B) En este gráfico se observa la exocitosis sincrónica en función del número de pulso del tren. La exocitosis sincrónica fue medida como la diferencia de capacitancia antes y después del pulso, promediada en una ventana temporal de 100 msec

### 5.5.2 Trenes a alta frecuencia

Frente a la aplicación de trenes de 70 PAs a 10 Hz nuestras células cromafines no respondieron en forma homogénea, sino que presentaron dos respuestas distintas. En algunos casos se observó un  $\Delta C_m$  al final del tren con un valor similar al tamaño del IRP, mientras que en otros casos el cambio fue aproximadamente el triple. Ejemplos de los dos tipos de respuestas se muestran en la figura 5.25. Agrupando las respuestas según esta

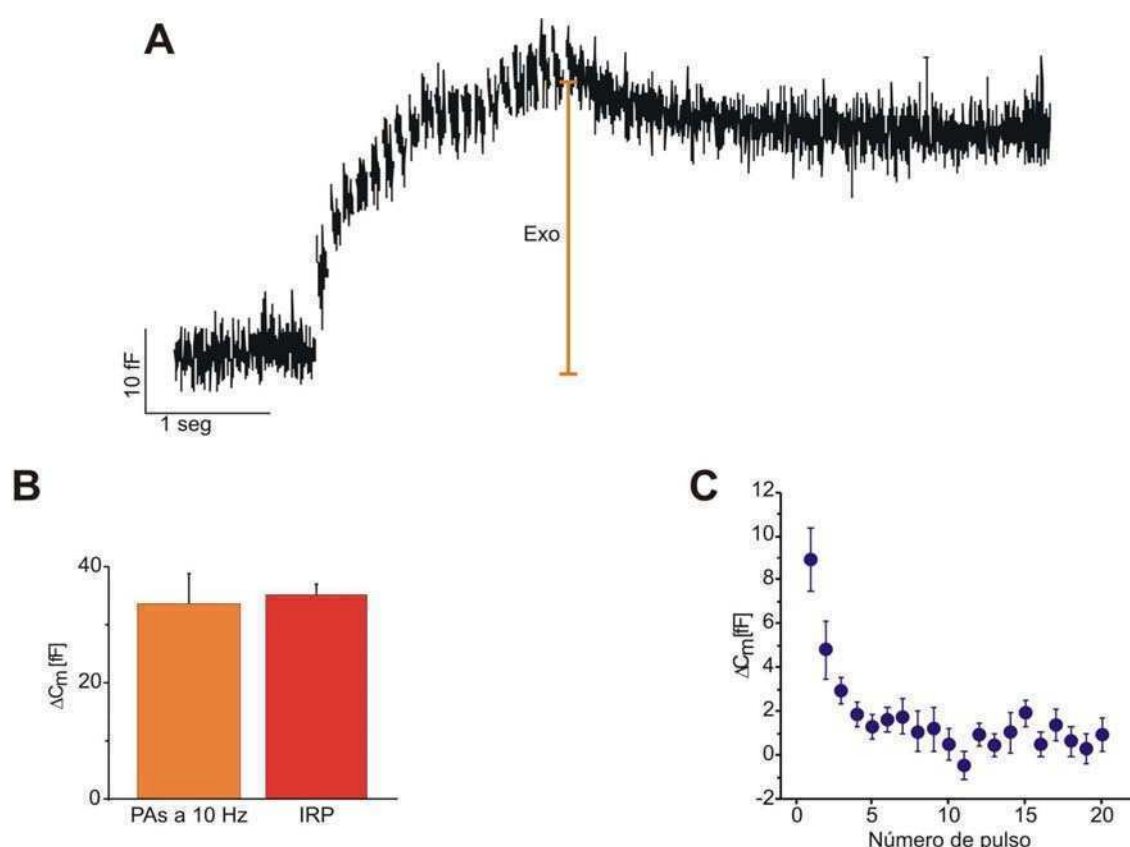


clasificación, el valor promedio del primer grupo fue de  $27 \pm 5$  fF ( $n=4$ ), y de los segundos de  $96 \pm 9$  fF ( $n=4$ ). En los trenes del segundo grupo se observó una respuesta bifásica. Una primera fase en la que la capacitancia después de unos 15 PAs llega a una meseta, y otra fase que se hace evidente después de los 25 pulsos en la que la capacitancia parece aumentar con una cinética lineal. La saturación transitoria observada luego de los 15 primeros PAs ( $35 \pm 6$  fF) coincide aproximadamente con el valor máximo de aumento en capacitancia alcanzado por los trenes del primer grupo, y con el tamaño promedio del IRP en condiciones controles.



**Figura 5.25** – Exocitosis producida por un tren de 70 PAs a 10Hz. Las respuestas frente a este protocolo fueron separadas en dos grupos. En (A) se muestra un ejemplo representativo de los que generan un  $\Delta C_m$  monofásico con un valor de saturación similar al IRP y (B) los que presentan una respuesta bifásica, generando finalmente una exocitosis mayor al IRP.

Para intentar aislar la liberación del IRP frente a las vesículas menos acopladas del RRP en los trenes a 10 Hz, se realizaron experimentos en los que se aplicaron solamente 20 pulsos, esto teniendo en cuenta que la meseta de los trenes con respuesta bifásica se observa normalmente entre los pulsos 15 y 25 pulsos (Figura 5.25B). Este tipo de tren (Figura 5.26A) generó un  $\Delta C_m$  total de  $33 \pm 5$  fF ( $n=14$ ), que no difiere significativamente del tamaño del IRP (Figura 5.26B). El análisis del componente sincrónico de los trenes a 10 Hz muestra una clara disminución con el número de pulsos que se debería al agotamiento del IRP (Figura 5.26C).



**Figura 5.26-** Respuesta a trenes de 20 PAs a 10 Hz. **(A)** En esta figura se muestra el promedio de los trenes generados por este protocolo de estimulación. En el trazado de capacitancia celular se observa que la respuesta se satura. La exocitosis total generada por esta estimulación se midió al final del tren como se indica por la línea naranja (Exo). **(B)** Las barra a la izquierda en esta figura representa el valor promedio de la exocitosis provocada por los trenes de PAs a 10 Hz ( $33 \pm 5$  fF,  $n=14$ ) comparada (barra a la derecha) con el  $\Delta C_m$  generado por un pulso de 50 mseg, que se utiliza como estimación del tamaño del IRP. **(C)** En esta figura se grafica el componente sincrónico generado por los PAs del tren en función del número de pulso.

### 5.5.3 Discusión

El estímulo fisiológico que induce la liberación de catecolaminas desde las células cromafines son potenciales de acción, que se disparan en estas células en respuesta a la estimulación ejercida por la acetilcolina liberada desde terminales nerviosos simpáticos. En esta sección se aplicaron trenes de PAs intentando simular el rango de frecuencias

fisiológicas de disparo de estas células en una condiciones de reposo (0,2-0,5 Hz) y de estrés (10Hz).

Los resultados experimentales de los trenes a bajas frecuencias muestran una clara respuesta exocitotica seguida por un decaimiento asociado a la endocitosis. En cuanto a la exocitosis, los resultados son consistentes con el tiempo característico de recuperación del PPA de 1 seg. Cuando los trenes de despolarizaciones son aplicados a una frecuencia de 0,2 Hz, la exocitosis sincrónica generada en cada pulso se mantiene constante durante el tren de 10 pulsos. Esto es consistente con que a esta frecuencia el tiempo entre PAs es de 5 seg, un valor 5 veces mayor al tiempo característico de recuperación del PPA de 1 seg. Este tiempo es suficiente para que este *pool* se recupere casi totalmente (99%). A diferencia de este resultado, cuando la frecuencia aumenta a 0,5 Hz, el componente sincrónico asociado a PPA ya no se mantiene constante, ya que un tiempo entre pulsos de 2 seg es suficiente para que la recuperación alcance sólo el 86%, por lo tanto se observa una cierta caída en la respuesta. Estos experimentos conjuntamente con los experimentos de recuperación del PPA indican que en nuestras condiciones experimentales (concentraciones de *buffers* de  $\text{Ca}^{2+}$  internos, temperatura ambiente) el PPA solamente estaría aproximadamente capacitado para responder de manera sostenida en el límite inferior del rango fisiológico de frecuencias de la célula cromafin. Es altamente probable que a temperaturas fisiológicas la velocidad de recuperación de PPA e IRP aumenten marcadamente y esto permita una respuesta sostenida a mayores frecuencias. Este aspecto deberá ser investigado en el futuro.

Por otro lado, a estas frecuencias (0,2 y 0,5 Hz), se evidenció una endocitosis rápida, compatible con la cinética que se observó para un PAs único. El tiempo característico de la endocitosis (0,7seg) a su vez podría ser compatible con la participación de este proceso en la recuperación de vesículas. Sin embargo, en la sección anterior se descartó que esta endocitosis estuviera implicada en la recuperación de vesículas del PPA, como podría suceder con un mecanismo de endocitosis rápida de tipo *kiss and run*. Esta endocitosis permite que durante los trenes a 0,2 hz se compensen completamente los cambios de superficie de membrana provocados por la exocitosis generada en cada pulso, con lo cual no se observa un aumento acumulativo en los valores de capacitancia celular. A una frecuencia de 0,5 Hz, sin embargo la endocitosis no llega a compensar totalmente la superficie de membrana, generando un aumento neto en  $\Delta C_m$ .

Es esperable, como ya se mencionó en secciones anteriores, que tanto la dinámica de recuperación de vesículas como también la endocitosis sean reguladas por la temperatura, pudiendo acelerar marcadamente estos dos procesos en condiciones fisiológicas. Por ejemplo, se observó que en neuronas del hipocampo en cultivo a una temperatura fisiológica (37°C), disminuye significativamente la liberación generada por un PA y aumenta la velocidad de recuperación del RRP en un factor 3 respecto a a una temperatura de 25°C (Pyott y Rosenmund, 2002). La combinación de un aumento en la velocidad de recuperación y una disminución en la probabilidad de liberación genera una reducción en la depresión sináptica acompañada de un aumento en el mantenimiento del componente sincrónico de liberación a frecuencias altas de estimulación (Pyott y Rosenmund, 2002). Otros trabajos, en la sinapsis gigante Calix de Held, mostraron un resultado similar, en el cual se reduce la duración del PA y también la depresión de la transmisión sináptica a altas frecuencias a temperaturas fisiológicas (Taschenberger y von Gersdorff, 2000). Estos resultados sugieren que a temperatura fisiológica se favorecería la estabilidad de la transmisión sináptica a frecuencias altas por el aumento en la velocidad de reclutamiento de vesículas y por una reducción en la cantidad de vesículas que se liberan en un PA.

En una situación de estrés las células cromafines aumentan su frecuencia de disparo hasta valores mayores a los 10 Hz. Frente a estímulos que simulan este patrón de estimulación se observan dos respuestas distintas. En algunos casos, un tren de 70 PAs a 10 Hz produjo un  $\Delta C_m$  similar al tamaño del IRP, y en otros el  $\Delta C_m$  total al final de tren fue varias veces mayor. Estos dos patrones de respuesta ya han sido observados en células cromafines bovinas estimuladas con trenes de pulsos despolarizantes cuadrados (Marengo, 2005), y podrían deberse a diferencias en la acumulación de  $Ca^{2+}$  citosólico que favorezca la traslocación de vesículas desde *pools* situados río arriba o el reclutamiento de vesículas más alejadas de las fuentes de  $Ca^{2+}$ , o bien a la presencia o pérdida (por diálisis en *whole cell*) de algún factor citoplasmático soluble que regule estos procesos de translocación.

Si las vesículas y los canales no estuvieran colocalizados como ocurre con las vesículas del IRP, la pequeña cantidad de calcio que entra durante un potencial de acción único probablemente no sería suficiente para estimular exocitosis vesicular (Zhou y Misler, 1995). Este resultado es compatible con la idea de que las vesículas del IRP serían las responsables de mantener la eficiencia de la respuesta en una condición fisiológica de reposo o de bajas frecuencias. Por otro lado, frente a una condición de estrés donde se disparan PA a altas frecuencias, la respuesta estaría inicialmente (aproximadamente durante los primeros 20 PA en nuestras condiciones) acotada por el tamaño del IRP, y luego

la acumulación de  $\text{Ca}^{2+}$  residual favorecería el reclutamiento de vesículas más alejadas de los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  y/o que se hallen en un inferior estado de maduración (Marengo, 2005).

## 6 DISCUSIÓN FINAL

Las células cromafines comparten el mismo origen embriológico que las neuronas del sistema autónomo simpático (Le Douarin y col., 2008) y conservan las propiedades de excitabilidad de la membrana y los mecanismos de exocitosis (Jahn, y col., 2003). Tanto la transmisión sináptica en las neuronas como la secreción de adrenalina por parte de las células cromafines está mediada por la entrada localizada de  $\text{Ca}^{2+}$  desde el medio extracelular a través de la activación de canales de  $\text{Ca}^{2+}$  dependientes de voltaje localizados en la membrana plasmática (Augustine y Neher, 1992). La organización espacial entre canales y vesículas condiciona las características del proceso de secreción, ya que las vesículas pueden ubicarse más cerca o más lejos de los sitios de entrada de  $\text{Ca}^{2+}$ , y en consecuencia adquirir diferente probabilidad de liberación. Una diferencia importante entre las terminales sinápticas y las células neuroendocrinas en general está en el grado de acoplamiento entre la excitación y la liberación de sustancias activas (Oré y Artalejo, 2004). El alto grado de acoplamiento que se observa en las terminales sinápticas, donde los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  están altamente acoplados a los sitios de liberación, puede ser explicado por la presencia de interacciones específicas entre los canales y las proteínas asociadas a las vesículas en la región *synprint*, presente en los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  tipo P/Q y N ha sido descrita como tal vez el principal candidato para participar de dicha interacción (Catterall, 1999). En experimentos “in vitro” se ha observado que el *synprint* interactúa con syntaxina, SNAP-25, synaptotagmina, CSP y RIM (Rettig J y col., 1996; Jarvis y Zamponi, 2005; Davies y Zamponi, 2008). Por otro lado, “in vivo” se observó que la inyección de *synprint* en el ganglio cervical simpático (SCGNs) redujo al 42% la transmisión sináptica (Mochida S, 1996). Por otro lado, la inyección del péptido *synprint* en neuronas de *Xenopus* produjo una reducción del 25% en la transmisión sináptica (Rettig y col., 1997). La optimización de la fusión de las vesículas en este sistema es esencial y tiene implicaciones fisiológicas, ya que los retrasos en la transmisión sináptica limitan la velocidad de procesamiento de la información en el sistema nervioso. En contraste, en las células cromafines, la velocidad con la que las hormonas secretadas hacen su efecto en los órganos blanco está limitada por el transporte de dichas hormonas por el torrente sanguíneo. Por lo tanto, estas células no tendrían, en principio la necesidad fisiológica de liberar hormonas en forma altamente acoplada. De hecho, existen evidencias experimentales y simulaciones computacionales que muestran que los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  y la mayoría de las vesículas preparadas para liberarse no están estrictamente colocalizados, y en promedio las vesículas secretorias se

ubicarían a 300 nm de los canales (Chow y col., 1992; Neher, 1998; Segura y col., 2000). Sin embargo, resultados presentados en esta tesis y previos de otros autores demuestran la existencia del IRP, un *pool* de alta eficiencia de liberación con características similares de acople vesícula-canal a las de las terminales nerviosas. El IRP se observó por primera vez frente a pulsos despolarizantes de corta duración, frente a los cuales se detectó la liberación sincrónica de un pequeño grupo de ~17 vesículas (Horrigan y Bookman, 1994; Voets y col., 1999). Clásicamente el IRP se definió como un *pool* formado por vesículas, igualmente maduras para liberarse que las otras que componen el RRP, pero ubicadas en zonas cercanas a los canales de  $\text{Ca}^{2+}$ . La proximidad con los canales permitiría que estas vesículas se encuentren sujetas a los gradientes locales de  $\text{Ca}^{2+}$  cuando se activan estos canales, y consecuentemente se liberen más rápidamente (Neher, 1998, Álvarez y Marengo, 2010). Los valores de tasa de liberación del IRP medidos en nuestras células en cultivo y por Voets y col., (1999) en rodajas de glándula adrenal,  $64 \text{ seg}^{-1}$  y  $150 \text{ seg}^{-1}$  respectivamente, son comparables con las tasas de liberación observadas en algunas preparaciones neuronales. Por ejemplo, en sinapsis de neuronas del hipocampo se midió un valor de  $150 \text{ seg}^{-1}$  (Goda y Stevens, 1994) y un valor de  $70 \text{ seg}^{-1}$  en las terminales nerviosas de la glándula pituitaria posterior de rata (Hsu y Jackson, 1996). Teniendo en cuenta la sensibilidad al  $\text{Ca}^{2+}$  de la maquinaria de fusión, la rapidez de la exocitosis y la distribución espacial de la señal de  $\text{Ca}^{2+}$ , la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  necesaria para la fusión de las vesículas secretorias durante una despolarización sólo se pueden alcanzar en un nanodominio de 10-30 nm alrededor de la boca del canal (Neher, 1998) o en un dominio de algunos cientos de nanómetros (microdominio) alrededor de un cluster de varios canales de  $\text{Ca}^{2+}$  (Robinson y col., 1995).

Hasta ese punto no estaba claro si el alto acoplamiento al que están expuestas las vesículas del *IRP* proviene de la interacción con algún subtipo de canal particular o con una población heterogénea de canales. Los resultados obtenidos en la Tesis de Licenciatura de la autora, mostraron fuertes evidencias de un acoplamiento específico entre las vesículas del IRP y los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  tipo P/Q (Álvarez y col., 2008). El primer objetivo de esta Tesis de doctorado fue profundizar la caracterización del acople funcional que se establece entre los canales de calcio dependientes de voltaje y el IRP. Los resultados experimentales confirmaron que los canales P/Q son marcadamente más eficientes que los canales del tipo L para liberar las vesículas secretorias altamente acopladas del IRP, y que dicho acople funcional es el resultado de la proximidad espacial entre vesículas y canales.

Los canales tipo N y P/Q son los más abundantes en las terminales nerviosas, en las cuales se colocan con las vesículas sinápticas en zonas activas de liberación (Caterall, 1999; Zamponi, 2003). En nuestro preparado de células cromafines se observó una contribución de los canales tipo L y P/Q a la corriente total. Si bien los canales L son los más abundantes, similarmente a lo que ocurre en las terminales sinápticas los canales P/Q son los que juegan el rol preponderante en la exocitosis frente a estímulos de corta duración, que permiten liberar las vesículas más acopladas a los canales. Además de nuestros resultados experimentales, en resultados previos de otros autores se observó que frente a una despolarización de corta duración que simula un potencial de acción único, el canal P/Q es significativamente más efectivo en liberar catecolaminas que el canal L (Chan y col., 2005). La mayor efectividad de los canales P/Q sobre los L fue también observada en resultados previos frente a un tren de PAs a frecuencias fisiológicas (0,5-15Hz) (Polo Parada y col., 2006). Además en este último trabajo, los autores observaron que los canales L podrían ser reclutados frente a un tren a alta frecuencia (15 Hz) después de la aplicación de 100 PAs (Polo Parada y col., 2006). En nuestros resultados observamos que el IRP se agotaría en un tren a 10 Hz aproximadamente después de 20 PAs, por lo tanto el reclutamiento de los canales L visto por estos autores podría ser una explicación de la liberación de las vesículas menos acopladas que ha sido observada en nuestros experimentos.

Dada que los resultados reafirman que el IRP es consecuencia de una interacción específica de las vesículas secretorias con los canales P/Q y no el resultado de una asociación al azar de vesículas y canales (ver capítulo 2 y sección 5.2), es lógico plantear la posibilidad de que debería existir un sitio de reconocimiento en los canales P/Q. Es sabido que la región *synprint*, la cual es capaz de interactuar con varias proteínas que conforman el complejo SNARE (syntaxina, SNAP-25 y synaptotagmina) y otras proteínas sinápticas como las proteínas CSP y RIM (Zamponi, 2003), se ubica específicamente en canales de tipo P/Q y N, pero no de tipo L (Spafford y Zamponi, 2003). Dado que nuestras células presentaron fundamentalmente corrientes tipo L y P/Q (Álvarez y col., 2008), es razonable plantear la hipótesis de que la interacción entre las vesículas del IRP y los canales P/Q se produzca a través de la región *synprint*. El segundo objetivo de esta tesis fue estudiar esta posibilidad. Los resultados muestran que el agregado de *synprint* produce una disminución significativa de la exocitosis del IRP. Por otro lado el efecto del *synprint* no apareció frente a estímulos capaces de liberar las vesículas poco acopladas. En resumen, los resultados apoyan la hipótesis de que el IRP es el resultado de la interacción entre un grupo de vesículas secretorias y los canales P/Q a través del sitio *synprint*.



Una pregunta que surge es: ¿Por qué solamente un pequeño grupo de vesículas, las contenidas en el IRP, se asocian a los canales de tipo P/Q por medio del *synprint*, y no pasa lo mismo con un mayor número de vesículas? Suponiendo una densidad de 12 canales por  $\mu\text{m}^2$  (Fenwick y col., 1982), en la célula habría alrededor de 4000 canales de  $\text{Ca}^{2+}$ . Tomando que la proporción de canales P/Q es del 44% (esta proporción es la que observamos experimentalmente en las corrientes de  $\text{Ca}^{2+}$  celulares) habrían ~1700 canales P/Q. Además según nuestras estimaciones los canales P/Q asociados a IRP están asociados en *clusters* de 6 canales, con lo cual tendríamos 280 *clusters*. El *pool* de vesículas preparadas para liberarse RRP, está formado por alrededor de 150 vesículas y el IRP por unas 20. Frente a estas estimaciones parece lógico pensar que todas las vesículas del RRP podrían acoplarse a canales P/Q. Sin embargo esto no se observa experimentalmente. La respuesta a esta pregunta podría estar relacionada con que no todos los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  tipo P/Q expresen el sitio de interacción *synprint* en las células cromafines. Una evidencia que apoya esta hipótesis fue observada en las células PC12, que son una línea celular tumoral derivada de las células cromafines. En estas células se observó que la variante dominante de canales P/Q, generada por *splicing* alternativo, no expresa el *synprint* (Rajapaksha y col., 2008). La porción remanente que expresa el *synprint* podría ser la explicación a la existencia de un *pool* acoplado a los canales P/Q, como es el IRP. Es interesante notar que debido a la expresión de la variante de *splicing* que no tiene el *synprint*, neuronas de hipocampo mostraron deficiencias en la formación de *clusters* de canales en las presinapsis, lo que sugiere que el *synprint* también podría estar relacionado en la formación de la estructura de las zonas activas (Rajapaksha y col., 2008). Este resultado experimental sugiere la posibilidad de que los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  con *synprint* que se asocian a la liberación del IRP se asocien en *clusters*. La existencia de *clusters* de canales asociados al IRP es compatible con los resultados obtenidos a través de modelos computacionales desarrollados en esta tesis (ver sección A.2.1) y por otros grupos (Segura y col., 2000).

La importancia fisiológica del IRP no está claramente establecida. El estímulo fisiológico que induce la liberación de catecolaminas desde las células cromafines son trenes de potenciales de acción, que se disparan en estas células en respuesta a la estimulación ejercida por la acetilcolina liberada desde terminales nerviosos simpáticos. En una situación de reposo la frecuencia de disparo de estas células es de aproximadamente 0,5 Hz, mientras que en condiciones de estrés, aumenta a valores mayores a 10 Hz. Es esperable que a bajas frecuencias de potenciales de acción no haya acumulación de  $\text{Ca}^{2+}$  residual, y consecuentemente las vesículas alejadas de los canales no estarían expuestas a una concentración suficiente de  $\text{Ca}^{2+}$  como para ser liberadas. En consecuencia ha sido

propuesto que, el IRP sería un *pool* que aseguraría una exocitosis de alta eficiencia capaz de sostener la secreción a esas bajas frecuencias (Olivos Oré y Artalejo, 2004). Sin embargo, la posibilidad que IRP cumpla con esta misión depende de su velocidad de recuperación. Por lo tanto, como tercer objetivo, nos preguntamos cuál es la velocidad de recuperación de este *pool*, y consecuentemente el rango de frecuencias al que puede responder de manera sostenida. Hallamos que la exocitosis generada frente a un PAs, proviene de un *subpool* del IRP, al que denominamos PPA. Nuestros resultados muestran que la recuperación del PPA es marcadamente más veloz que las del resto del IRP, lo cual permite que las células respondan a trenes de PA a frecuencias bajas en forma sostenida. La aplicación de trenes de PAs a una frecuencia de 0,2 Hz, mostró que el componente sincrónico de la exocitosis se mantiene constante a lo largo de 10 pulsos sucesivos. A frecuencias un poco mayores, como 0,5 Hz, la respuesta no llega a ser sostenida durante los 10 pulsos, sin embargo, es altamente probable que este límite de frecuencias este subestimado con respecto a las condiciones fisiológicas reales, fundamentalmente debido a la diferencia de temperatura entre nuestros experimentos (aproximadamente 25°C) y la existente en una condición fisiológica. En las células cromafines se observó que a una temperatura de 37°C, tanto el tamaño como la velocidad de recuperación del RRP están aumentados marcadamente respecto a una temperatura de 25°C (Dinkelacker y col., 2000). Además, resultados experimentales en preparados neuronales muestran que a la temperatura fisiológica (37°C), se favorece la estabilidad de la transmisión sináptica en un mayor rango de frecuencias por el aumento en la velocidad de reclutamiento de vesículas y por una reducción en la cantidad de vesículas que se liberan en un PA (Taschenberger y von Gersdorff, 2000; Pyott y Rosenmund, 2002). Suponiendo que la recuperación del PPA es acelerada en un factor 3 cuando la temperatura se eleva desde 22 a 37°C, tomando el valor observado por Dinkelacker y col. (2000) en células cromafines para la recuperación del RRP, la recuperación del PPA pasaría a un valor del orden de los 300 msec. Este tiempo de recuperación le permitiría a las células responder de manera sostenida a frecuencias de hasta ~3 Hz.

En cuanto a la recuperación del PPA, nuestros resultados experimentales indican que se efectuaría a expensas de las otras vesículas del IRP, y rechazan la hipótesis que plantea que la recuperación del PPA se produce a través de un mecanismo de *kiss and run* (Chan y Smith, 2003). Frente a estas evidencias, planteamos la hipótesis de que las vesículas del IRP y el PPA representen dos estados madurativos diferentes que se disponen de manera secuencial (Figura 5.19B), y tienen en común la proximidad de sus vesículas con los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  tipo P/Q. La maduración al estado final PPA, podría ser dependiente de  $\text{Ca}^{2+}$ . El

hecho de que frente a un pulso despolarizante de 50 mseg se libere todo el IRP, podría ser explicado por este tipo de esquema. La idea es que cuando las estimulaciones son de corta duración, y por lo tanto se induce una entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  pequeña, se liberaría solamente el PPA. En esa situación el IRP actuaría rellenando el PPA con una tasa de traspaso de vesículas de  $1 \text{ seg}^{-1}$ . Cuando los pulsos despolarizantes son más largos, y por lo tanto el  $\text{Ca}^{2+}$  permanece alto durante más tiempo la tasa de traspaso aumentaría su valor y consecuentemente el tamaño del PPA aumentaría velozmente a expensas del resto del IRP. Este proceso podría interpretarse como un proceso de facilitación por  $\text{Ca}^{2+}$  que podría estar favorecido por la proximidad espacial de canales y vesículas dentro del IRP.

## ***Anexo: Simulaciones computacionales***

En esta sección se desarrollan simulaciones de la dinámica del calcio y liberación de vesículas para entender el acople de la exocitosis con la estimulación y el reciclado de vesículas en las células cromafines. La simulación contempla la entrada del  $\text{Ca}^{2+}$  por los canales, la difusión tridimensional del  $\text{Ca}^{2+}$  y la liberación de las vesículas (ver sección 4.6). Estas simulaciones incorporan algunas de las hipótesis planteadas a partir de los datos experimentales así como también parámetros conocidos experimentalmente a partir de este y otros trabajos.

### ***A.1 Condiciones iniciales***

En las simulaciones se tomaron como condiciones iniciales los parámetros que se describen a continuación para las corrientes y los *buffers*.

#### ***A.1.1 Corrientes de calcio***

En las simulaciones se consideró una única fuente de  $\text{Ca}^{2+}$  ubicada en el centro de la superficie de un cubo de 1  $\mu\text{m}$  de lado (ver sección 4.6.1). Durante la despolarización se activa una corriente simulada con el modelo de Hodgkin y Huxley de dos compuestas (ver sección 4.6.2). El valor de la corriente que se activa frente a la despolarización tiene la forma de una corriente macroscópica, o sea la que normalmente se mide en la configuración *whole cell*, pero con el valor de corriente proporcional al área de la simulación. Esta descripción de la corriente no es la precisamente correcta para un canal único. En realidad, cada canal de  $\text{Ca}^{2+}$  se abre y cierra en forma estocástica y la integración de todos los canales produce la corriente que se mide en una configuración *whole cell*. Una descripción probabilística de la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  por los canales fue simulada en algunos trabajos los cuales concluyeron que esta descripción introduce pequeñas fluctuaciones en la señal de  $\text{Ca}^{2+}$  que no generan diferencias importantes en el estudio de la secreción en las células cromafines (Klingauf y Neher ,1997; Segura y col., 2000). Estos autores, coinciden en que esas fluctuaciones podrían llegar a ser importantes en la liberación de neurotransmisores en sinapsis para las cuales el volumen de simulación es varias veces menor (Yamada y Zucker, 1992). Como ya veremos, nuestras simulaciones predicen que la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  es en realidad a partir de un *cluster* de varios canales.

Como se dijo arriba, la corriente en el modelo ( $ICa^{2+}_m$ ) es calculada de forma que represente la fracción de la corriente total ( $ICa^{2+}_t$ ) que corresponde al área simulada. La relación entre  $ICa^{2+}_t$  y  $ICa^{2+}_m$  depende del grado de polarización de las células (es decir de una distribución de canales polarizada u homogénea). Un grado de polarización alto es esperable en una situación fisiológica, ya estas células establecen un contacto directo con los capilares sanguíneos hacia donde se secretan las catecolaminas (ver figura 1.1). Sin embargo en las células en cultivo esta polarización tiende a desaparecer (Marengo y Monck, 2000) por la pérdida del acople con los capilares. Si suponemos que no existe polarización, la relación entre la corriente total y la corriente en el modelo es proporcional a la relación entre las áreas. Suponiendo un radio promedio de las células cromafines de 5  $\mu m$  la relación entre las corrientes del modelo y la corriente total se muestra en la ecuación 1.

$$\frac{S_{cell}}{S_m} = \frac{4\pi r^2}{l^2} = \frac{4\pi(5\mu m)^2}{1\mu m^2} = 100\pi \quad (A.1)$$

$$ICa^{2+}_m = \frac{ICa^{2+}_t}{314}$$

La corriente promedio experimental obtenida para pulsos cuadrados de distintas duraciones entre 5 y 50 mseg fue de 180 pA, este valor corresponde a una corriente total en la simulación de 0,6 pA calculada por la ecuación 1. A su vez la corriente en el área simulada debe dividirse por el número de canales. Basándose en el análisis de ruido Fenwick y col., (1982) estimaron una corriente única de los canales de  $Ca^{2+}$  de 30 fA a un potencial de membrana de + 10 mV y con 1 mM de  $Ca^{2+}$  externo. En el trabajo de Klingauf y Neher, (1997) asumieron que para 5 mM de  $Ca^{2+}$  externo la corriente de canal único aumentaba a 50 fA. El número de canales compatible con este valor de corriente única y la corriente de simulación de 0,6 pA, es de 12 canales ( $12 \text{ canales}/\mu m^2$ ). Este valor es consistente con la densidad de canales estimada entre 5-15  $\text{canales}/\mu m^2$  en células cromafines bovinas (Fenwick y col., 1982).

### A.1.2 Buffers

Las simulaciones contemplan un *buffer* fijo y un *buffer* móvil exógeno (EGTA) cuyas constantes se detallan en la tabla A.1. Las constantes utilizadas para el *buffer* fijo corresponden a la calbindina 9kD (Forsen, S. y col., 1988), una proteína citosólica que tiene dos sitios de interacción con calcio (Heizmann y Braun, 1992) (ver las constantes en la tabla A.1).

<b>Geometría</b>		
Lado del cubo	1	$\mu m$
$\Delta x$	30	nm
<b>Ca<sup>2+</sup></b>		
$I Ca^{2+}_t$	180	pA
$I Ca^{2+}_m$	0,6	pA
$I Ca^{2+}_{único}$	50	fA
$[Ca^{2+}]_{\text{citoplasmático basal}}$	0,1	$\mu M$
$D_{Ca^{2+}}$	220	$\mu m^2 \text{ seg}^{-1}$
<b>Buffer fijo</b>		
<b>Calbindina</b>		
$[B_i]$	300	$\mu M$
$K_D$	10	$\mu M$
$k_{on}$	$5 \times 10^8$	$M^{-1} \text{ seg}^{-1}$
<b>Buffer móvil</b>		
<b>EGTA</b>		
$[B_i]$	500	$\mu M$
$K_D$	0,15	$\mu M$
$k_{on}$	$1 \times 10^7$	$M^{-1} \text{ seg}^{-1}$
$D_B$	220	$\mu m^2 \text{ seg}^{-1}$
<b>Exocitosis</b>		
$k_{on}$	8	$\mu M^{-1} \text{ seg}^{-1}$
$k_{off}$	105	$\text{seg}^{-1}$
$\gamma$	1	$\text{seg}^{-1}$
$Kd$	13	$\mu M$
$*h$	20	nm

**Tabla A.1-** Parámetros utilizados como condiciones iniciales en las simulaciones. \*h es la distancia membrana sensor.

## A.2 Simulaciones

### A.2.1 Exocitosis del IRP

La distancia entre los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  y las vesículas del IRP ha sido estimada en  $\sim 30$  nm mientras que las demás del RRP estarían en zonas más alejadas de la fuente a  $\sim 300$  nm (Segura y col., 2000 y Klingauf y Neher, 1998). En esta sección se simuló una situación experimental en la que se aplican pulsos despolarizantes de distintas duraciones (equivalente a los experimentos representados en la figura 5.2A). En estos experimentos se evidenció la liberación del IRP frente a despolarizantes de duraciones menores a 50 mseg. El valor del IRP experimental obtenido del ajuste del valor asintótico de la respuesta a pulsos despolarizantes menores a 50 mseg, fue de 33 fF (Figura 5.1A de Resultados y discusión). Tomando un valor para el RRP de 120 fF, que se obtiene promediando el  $B_{\min}$  y el  $B_{\max}$  medido para este *pool* (Figura 5.2B de resultados y discusión), el IRP corresponde a un  $\sim 27\%$  del RRP. Suponiendo un esquema en el cual el 27% del RRP (33 fF) se ubica a una distancia fija de 30 nm de la fuente de calcio, que puede ser un canal o un *cluster* de canales, y el resto a 300 nm (87 fF), se ajustó la corriente total ( $\text{ICa}^{2+}_m$ ) que se necesita para que con un pulso de 50 ms. el modelo libere un valor similar al del IRP (Tabla A.2). En la tabla se muestra para los valores de corriente del modelo ( $\text{ICa}^{2+}_m$ ), la exocitosis generada por las vesículas a 30 nm, a 300 nm y la suma de ambas exocitosis. Además, en la última columna se muestra el número de canales que corresponderían a cada valor de corriente, tomando un valor de 50 fA para cada canal. A partir de un valor de corriente de 0,3 pA la exocitosis simulada del IRP llega a su valor límite de los 33 fF. Por esta razón este valor es el utilizado en el resto de las simulaciones.

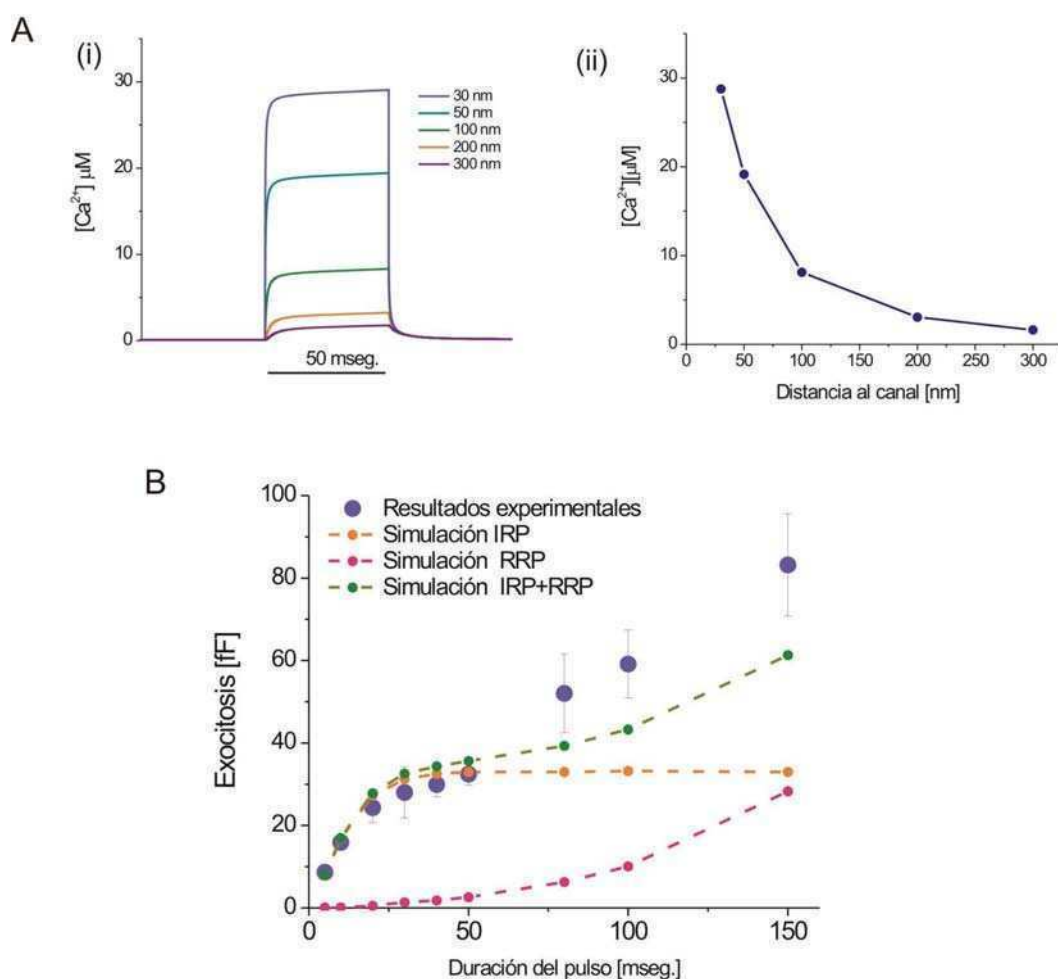
Una corriente de 0,3 pA genera en la simulación el perfil de la  $[\text{Ca}^{2+}]$  que se muestra en la figura 1A-i. Con este valor de corriente la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  alcanza valores cercanos a los 30  $\mu\text{M}$  a una distancia de 30 nm del canal, como se puede observar en la figura 1A-ii. Habiendo fijado la corriente, se simuló la exocitosis generada por pulsos cuadrados de distintas duraciones entre 5 mseg y 150 mseg. En la figura 5.2A de la sección 5.1.2 se muestran los resultados para duraciones entre 5 y 50 ms, mientras que en la figura 1B se muestran los resultados para todas las duraciones.

$ICa^{2+}_m$ [pA]	Exo a 30nm	Exo a 300nm	Suma	Nº de Canales
0,2	29,7	0,5	30,2	4
0,25	31,7	1,3	33,0	5
<b>0,3</b>	<b>33,0</b>	<b>2,3</b>	<b>35,3</b>	<b>6</b>
0,35	33,0	4,2	37,2	7
0,4	33,0	6,1	39,1	8
0,5	33,0	8,2	41,2	10

**Tabla A.2-** En esta tabla se muestran los diferentes valores de corriente de  $Ca^{2+}$  que se testearon para encontrar un valor de exocitosis total (suma) que se ajuste a la liberación del IRP. Para cada corriente se muestra en las distintas columnas la exocitosis simulada a 30 y a 300 nm, y la suma de ambas. En la última columna se estimó el número de canales que correspondería a las corrientes asumidas en la primera columna, suponiendo una corriente de canal único de 50 fA.

La exocitosis simulada para los pulsos menores a 50 mseg reproducen satisfactoriamente los valores experimentales (Figura 1B). Por otro lado, la exocitosis simulada por nuestro modelo para pulsos de duraciones mayores a 50 mseg si bien reproducen la forma de la curva experimental, los valores simulados están por debajo de los experimentales. Este resultado podría estar relacionado con que las vesículas ubicadas a 300 nm no están expuestas sólo a la entrada de  $Ca^{2+}$  por un solo canal o *cluster* de canales, como se supone en el modelo, sino que su liberación puede ser resultado de la suma de las señales de calcio en la que contribuirían también otros canales localizados fuera del *cluster* (Figura 1B).

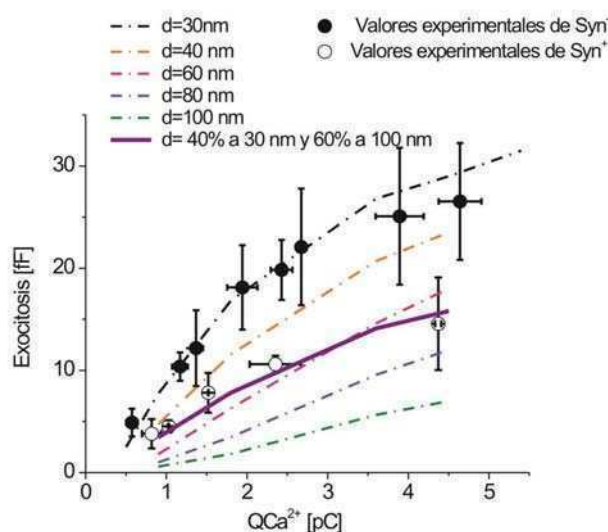




**Figura A.1-** Simulaciones de la amplitud de la  $[Ca^{2+}]$  a distintas distancias del canal y de la exocitosis generada por pulsos despolarizantes entre 5-150 mseg. (A) (i) En el gráfico se observa la  $[Ca^{2+}]$  en función del tiempo en respuesta a un pulso de 50 mseg a distintas distancias, entre 30 y 300 nm del canal. (ii) Las valores máximos de  $[Ca^{2+}]$  alcanzados para las distintas distancias se grafican en función de dichas distancias. (B) En esta figura se comparan los resultados de la exocitosis simulada para pulsos de distinta duración (5-150 mseg) con los valores experimentales. En estas simulaciones se consideró que las vesículas del IRP se encuentran a una distancia de 30 nm del cluster de canales y las demás vesículas componentes del RRP a 300 nm se realizaron simulaciones considerando solamente a las vesículas del IRP, solamente a las del RRP y también se muestra la suma de ambas. En ambos casos se utilizó un buffer fijo (Calbindina) y uno exógeno (EGTA). La corriente utilizada para la simulación fue 0,3 pA.

### A.2.2 Efecto del *synprint* sobre la exocitosis del IRP

Los resultados experimentales obtenidos del agregado del péptido *synprint* exógeno indican que la interacción canal-vesícula es desacoplada bajo esas condiciones, lo que produce una inhibición de la exocitosis de IRP. Para estimar la distancia promedio efectiva a la cual se ubicarían las vesículas respecto del canal de  $\text{Ca}^{2+}$  en presencia de *synprint* exógeno, se simuló la exocitosis en respuesta a despolarizaciones entre 5 y 50 ms, pero ubicando a las vesículas del IRP a distintas distancias del canal. Estas simulaciones se hicieron tomando el mismo número de vesículas y la misma corriente que en la sección anterior (ver sección A.2.1) pero se varió la distancia de las vesículas del IRP. Partiendo de la condición control en la cual el IRP está a una distancia de 30 nm, se consideraron distancias ( $d$ ) de 40, 60, 80 y 100 nm (Figura 2-líneas punteadas). Además de estas distancias, también se simuló un caso en el que el 40% de las vesículas del IRP se ubicaron a 30 nm y el resto a 100 nm (Figura 2-línea sólida). En el gráfico de la figura 2 se representa la exocitosis de IRP en función de las integrales de corriente, tanto para los valores experimentales (círculos llenos,  $\text{Syn}^-$ , y círculos abiertos  $\text{Syn}^+$ ) como para las simulaciones. Los valores experimentales de la integral de corriente se calcularon como el valor de la corriente pico multiplicado por la duración del pulso (un resumen de estos resultados también fueron representados en la figura 5.7 de la sección 5.3.1).



**Figura A.2** - En esta figura se muestran los resultados de las simulaciones que intentan reproducir el efecto observado experimentalmente del agregado del *synprint* exógeno. Las líneas punteadas

*representan las simulaciones considerando a las vesículas del IRP a distintas distancias del canal. Las simulaciones se realizaron para distancias entre 30 nm y 100 nm. La línea sólida violeta representa una simulación en la que se consideró el 40% de las vesículas a 30 nm y el resto a 100 nm. Los valores experimentales se muestran en la figura para comparar los resultados con la simulación (círculos llenos y vacíos).*

## REFERENCIAS

**Aguilar JS, Ballesta JJ, Reig JA, Palmero M, Viniegra S, Criado M.** Muscarinic receptor subtypes in bovine adrenal medulla. *Neurochem Res.* 17:1235-1239, 1992.

**Albillos A, Dernick G, Horstmann H, Almers W, Álvarez de Toledo G, Lindau M.** The exocytotic event in chromaffin cells revealed by patch amperometry. *Nature* 2:389(6650):509-512, 1997.

**Albillos A, Neher E, Moser T.** R-Type  $\text{Ca}^{2+}$  channels are coupled to the rapid component of secretion in mouse adrenal slice chromaffin cells, *J. Neurosci.* 20:8323–8330, 2000.

**Aldea M, Jun K, Shin HS, Andres Mateos E, Solis Garrido LM, Montiel C, Garcia AG, Albillos A.** A perforated patch-clamp study of calcium currents and exocytosis in chromaffin cells of wild-type and alpha (1A) knockout mice. *J Neurochem.* 81:911-21, 2002.

**Alés E, Tabares L, Poyato JM, Valero V, Lindau M, Álvarez de Toledo G.** High calcium concentrations shift the mode of exocytosis to the kiss-and-run mechanism. *Nat Cell Biol* 1: 40–44, 1999.

**Alés E, Fuentealba J, García AG, López MG.** Depolarization evokes different patterns of calcium signals and exocytosis in bovine and mouse chromaffin cells: the role of mitochondria. *Eur J Neurosci.* 21(1):142-50, 2005.

**Allbritton, N. L., T. Meyer, and L. Stryer.** Range of messenger action of calcium ion and inositol 1,4,5-triphosphate. *Science.* 258:1812–1815, 1992.

**Aloe L, Levi-Montalcini R.** Nerve growth factor induced transformation of immature chromaffin cells in vivo into sympathetic neurons: effect of anti-sense to nerve growth factor. *Proc Natl Acad Sci USA* 76:1246–1250, 1979.

**Alonso MT, Barrero MJ, Michelena P, Carnicero E, Cuchillo I, Garcia AG, Garcia Sancho J, Montero M, Álvarez J.**  $\text{Ca}^{2+}$  induced  $\text{Ca}^{2+}$  release in chromaffin cells seen from inside the ER with targeted aequorin. *J Cell Biol* 144:241–254, 1999.

**Álvarez J, Montero M, Garcia-Sancho J.** Subcellular  $\text{Ca}^{2+}$  dynamics. News Physiol Sci 14:161–168, 1999.

**Álvarez YD, Ibañez L I, Uchitel, OD, Marengo FD.** P/Q  $\text{Ca}^{2+}$  channels are functionally coupled to exocytosis of the immediately releasable *pool* in mouse chromaffin cells. Cell Calcium 43: 155–164, 2008.

**Álvarez YD y Marengo FD.** The immediately releasable *pool*: Highly coupled secretion in chromaffin cells and others neuroendocrine cells. Journal of Neurochemistry 116: 155–163, 2011.

**Ames WF.** Numerical methods for parcial diferencial equations. Academic Press, 2nd Edition. 1977.

**Annaert WG, Llona I, Backer AC, Jacob WA, De Potter WP.** Catecholamines are present in a synaptic-like microvesicle-enriched fraction from bovine adrenal medulla. J Neurochem 60:746-1754, 1993.

**Anderson DJ, Axel R.** A bipotential neuroendocrine precursor whose choice of cell fate is determined by NGF and glucocorticoids. Cell 47:1079-1090, 1986.

**Arroyo G, Aldea M, Fuentealba J, Albillos A, Garcia AG.** SNX482 selectively blocks P/Q  $\text{Ca}^{2+}$  channels and delays the inactivation of  $\text{Na}^+$  channels of chromaffin cells, Eur. J. Pharmacol. 475:11–18, 2003.

**Artalejo C, Adams M, Fox A.** Three types of  $\text{Ca}^{2+}$  channel trigger secretion with different efficacies in chromaffin cells. Nature: 6; 367(6458):72-76, 1994.

**Artalejo C, Perlman R, Fox AP.** Omega-conotoxin-GVIA blocks a  $\text{Ca}^{2+}$  current in bovine chromaffin cells that is not the classic N type. Neuron 8:85-95, 1992.

**Artalejo C, Elhamdani A, Palfrey H.** Sustained stimulation shifts the mechanism of endocytosis from dynamin-1-dependent rapid endocytosis to clathrin and dynamin-2-mediated slow endocytosis in chromaffin cells. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. 99:6358-63, 2002.

**Artalejo AR.** La maquinaria molecular de la exocitosis en las células cromafines de la médula adrenal. Anal Real Acad Nac. Farm. 71:127-151, 2005.

**Augustine GJ y Neher E.** Calcium requirements for secretion in bovine chromaffin cells. *J. Physiol* 450:247-271, 1992.

**Arroyo G, Aldea M, Fuentealba J, Albillos A, García AG.** SNX482 selectively blocks P/Q  $\text{Ca}^{2+}$  channels and delays the inactivation of  $\text{Na}^{+}$  channels of chromaffin cells, *Eur J Pharmacol* 475 (2003) 11-18.

**Ashery U, Varoqueaux F, Voets T, Betz A, Thakur P, Koch H, Neher E, Brose N, Rettig J.** Munc13-1 acts as a priming factor for large dense-core vesicles in bovine chromaffin cells. *EMBO J.* 19(14):3586-96, 2000.

**Atlas, D.** Functional and physical coupling of voltage-sensitive calcium channels with exocytotic proteins: ramifications for the secretion mechanism. *Journal of Neurochemistry.* 77:972-985, 2001.

**Augustine GJ, Neher E.** Calcium requirements for secretion in bovine chromaffin cell. *J. Physiol* 450:247-271, 1992.

**Aunis D.** Exocytosis in chromaffin cells of the adrenal medulla. *Int Rev Cytol* 181:213-320, 1998.

**Babcock DF, Herrington J, Goodwin PC, Park YB, Hille B.** Mitochondrial participation in the intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  network. *J Cell Biol* 136:833–844, 1997.

**Banks P, Helle K.** The release of protein from stimulated adrenal medulla. *Biochem J* 97:40C-41C, 1965.

**Barald KF.** Monoclonal antibodies to embryonic neurons: cell-specific markers for chick ciliary ganglion. *Neuronal Development*, 101–119. Plenum Press, New York, 1982.

**Barg S, Ma X, Eliasson L, Galvanovskis J, Gopel SO, Obermuller S, Platzer J, Renstrom E, Trus M, Atlas D, Striessnig J, Rorsman P.** Fast Exocytosis with Few  $\text{Ca}^{2+}$  Channels in Insulin-Secreting Mouse Pancreatic B Cells. *Biophysical Journal* 81:3308–3323, 2001.

**Barg S, Eliasson L, Renstrom E, Rorsman P.** A Subset of 50 Secretory Granules in Close Contact With L-Type  $\text{Ca}^{2+}$  Channels Accounts for First-Phase Insulin Secretion in Mouse Cells. *DIABETES*, 51(1):74-82, 2002.

- Becherer U, Moser T, Stuhmer W, Oheim M.** Calcium regulates exocytosis at the level of single vesicles. *Nat Neurosci* 6:846–853, 2003.
- Becherer Ute, Mathias Pasche, Shahira Nofal, Detlef Hof, Ulf Matti, Jens Rettig.** Quantifying Exocytosis by Combination of Membrane Capacitance Measurements and Total Internal Reflection Fluorescence Microscopy in Chromaffin Cells. *Cells. PLoS ONE* 2(6): 2007.
- Becherer U y Rettig J.** Vesicle *pools*, docking, priming, and release. *Cell Tissue Res* 326:393–407, 2006.
- Bernardi P.** Mitochondrial transport of cations: channels, exchangers, and permeability transition. *Physiol Rev* 79:1127–1155, 1999.
- Biales B, Dichter M, Tischler A.** Electrical excitability of cultured adrenal chromaffin cells. *J Physiol* 262:743–753, 1976.
- Bilodeau ML, Boulineau T, Hullinger RL, Andrisani OM.** Cyclic AMP signaling functions as a bimodal switch in sympathoadrenal cell development incultured primary neural crest cells. *Mol Cell Biol* 20:3004–3014, 2000.
- Bilodeau ML, Ji M, Paris, M, Andrisani OM.** Adenosine signaling promotes neuronal, catecholaminergic differentiation of primary neural crest cells and CNS-derived CAD cells. *Mol Cell Neurosci* 29:394–404, 2005.
- Bittner MA, Holz RW.** Kinetic análisis of seretion from permeabilizad adrenal chromaffin cells reveals distinct components. *J Biol Chem* 267:16219-16225, 1992.
- Bokvist K, Eliasson L, Ammala C, Renstro E, Rorsman P.** Co-localization of L-type  $\text{Ca}^{2+}$  channels and insulincontaining secretory granules and its significance for the initiation of exocytosis in mouse pancreatic B-cells. *EMBO J.* 14:50-57, 1995.
- Borges R, Machado JD.** Chromaffin cell research in the new millennium. *TRENDS in pharmacological science*, 23 (2):53-55, 2002.
- Bornstein SR, Ehrhart-Bornstein M, Scherbaum WA.** Morphological and functional studies of the paracrine interaction between cortex and medulla in the adrenal gland. *Microsc Res Tech* 15:520–533, 1997.

- Bossu JL, De Waard M, Feltz A.** Inactivation characteristics reveal two calcium currents in adult bovine chromaffin cells. *J Physiol.* 437:603-620, 1991.
- Brandt BL, Hagiwara S, Kidokoro Y, Miyazaki S.** Action potentials in the rat chromaffin cell and effects of acetylcholine. *J Physiol.* 263:417-39, 1976.
- Bredderman PJ, Wasserman RH.** Chemical composition, affinity for calcium, and some related properties of the vitamin D dependent calcium-binding protein. *Biochemistry.* 1974 Apr 9;13(8):1687-94.
- Brumback A, Lieber J, Angleson Betz W.** Using FM1-43 to study neuropeptide granule dynamics and exocytosis. *Methods.* 33:287-294, 2004.
- Bruns D.** Detection of transmitter release with carbon fiber electrodes. *Methods Enzymol* 33:312-321, 2004.
- Burgoyne RD, Morgan A.** Secretory granule exocytosis. *Physiol Rev.* 83:581-632, 20
- Buffa R, Mare P, Salvatore M, Solcia E, Furness JB, Lawson DE.** Calbindin 28 kDa in endocrine cells of known or putative calcium-regulating function. Thyro-parathyroid C cells, gastric ECL cells, intestinal secretin and enteroglucagon cells, pancreatic glucagon, insulin and PP cells, adrenal medullary NA cells and some pituitary (TSH?) cells. *Histochemistry.* 1989;91(2):107-13.
- Carabelli V, Marcantoni A, Comunanza V, Carbone E.** Fast exocytosis mediated by T- and L-type channels in chromaffin cells: distinct voltage-dependence but similar  $\text{Ca}^{2+}$ -dependence *Eur Biophys J.* 36:753–762, 2007.
- Carbone E, Giacippoli A, Marcantoni A, Guido D, Carabelli V.** A new role for T-type channels in fast "low-threshold" exocytosis. *Cell Calcium.* 40:147-54, 2006.
- Cárdenas AM y Marengo FD.** Rapid endocytosis and vesicle recycling in neuroendocrine cells. *Cell Mol Neurobiol.* 30(8):1365-1370, 2010.
- Catterall W.** Interactions of presynaptic  $\text{Ca}^{2+}$  channels and SNARE proteins in neurotransmitter release. *Annals of the New York Acad. of Science.* 868:44-159, 1999.
- Catterall W.** Structure and regulation of voltage-gated  $\text{Ca}^{2+}$  channels. *Annual review cell development in biology.* 16:521-555, 2000.



- Cecarelli B, Hurlbut WP y Mauro A.** Turnover of transmitter and synaptic vesicles at the frog neuromuscular junction. *J Cell Biol* 57, 499-524, 1973.
- Chad JE, Eckert R.** Calcium domains associated with individual channels can account for anomalous voltage relations of CA-dependent responses. *Biophys J.* 45(5):993-9, 1984.
- Chan SA, Doreian B, Smith C.** Dynamin and myosin regulate differential exocytosis from mouse adrenal chromaffin cells. *Cell Mol Neurobiol.* 30:1351-1357, 2010.
- Chan SA y Smith C.** Physiological stimuli evoke two forms of endocytosis in bovine chromaffin cells. *Journal of Physiology* 537.3, 871–885, 2001.
- Chan SA y Smith C.** Low frequency stimulation of mouse adrenal slices reveals a clathrin independent, protein kinase C mediated endocytic mechanism. *J. Physiol.* 553, 707-717, 2003.
- Chan SA, Polo-Parada L, Smith C.** Action potential stimulation reveals an increased role for P/Q-calcium channel-dependent exocytosis in mouse adrenal tissue slices. *Arch Biochem Biophys.* 435(1):65-73, 2005.
- Cheek TR y Barry VA.** Stimulus secretion coupling in excitable cells. a central role for calcium. *J Exp Biol* 184: 183-196, 1993.
- Chen G, Gillis K.** The noise of membrane capacitance measurements in the whole cell-recording configuration. *Biophys J.* 79:2162-2170, 2000.
- Chow RH, von Rüden L, Neher E.** Delay in vesicle fusion revealed by electrochemical monitoring of single secretory events in adrenal chromaffin cells. *Nature* (5) 356, 60-63, 1992.
- Chow RH, Klingauf J, Neher E.** Time course of  $\text{Ca}^{2+}$  concentration triggering exocytosis in neuroendocrine cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 91:12765–12769, 1994.
- Chow RH, Klingauf J, Heinemann C, Zucker R, Neher E.** Mechanisms determining the time course of secretion in neuroendocrine cells. *Neuron* 16, 369-376, 1996.
- Cox JA, Milos M, MacManus JP.** Calcium- and magnesium-binding properties of oncomodulin. *J. Biol. Chem.* 265:6633-6637, 1990.

- KPM Currie, Fox AP**, Comparison of N- and P/Q-type voltage-gated calcium channel current inhibition, *J Neurosci* 17 (1997) 4570-4579.
- Crivellato E, Nico B, Ribatti D**. The chromaffin vesicle: advances in understanding the composition of a versatile, multifunctional secretory organelle. *Anat Rec* 291(12):1587-1602, 2008.
- De Diego AMG, Gandia L, Garcia AG**. A physiological view of the central and peripheral mechanisms that regulate the release of catecholamines at the adrenal medulla. *Acta Physiol.* 192:287–301, 2008.
- De Diego AMG**. Electrophysiological and morphological features underlying neurotransmission efficacy at the splanchnic nerve-chromaffin cell synapse of bovine adrenal medulla. *Am J Physiol Cell Physiol.* 298:397-405, 2010.
- Dean GE, Nelson PJ, Rudnick G**. Characterization of native and reconstituted hydrogen ion pumping adenosinetriphosphatase of chromaffin granules. *Biochemistry.* 26: 25(17):4918-4925, 1986.
- Del Toro R, Levitsky KL, López-Barneo J, Chiara MD**. Induction of T-type calcium channel gene expression by chronic hypoxia. *J Biol Chem.* 278:22316-24, 2003.
- Del Castillo J y Engback L**. The nature of the neuromuscular block produced by magnesium. *J. Physiol* 124:370-384, 1954.
- Díaz-Flores L, Gutiérrez R, Varela H, Valladares F, Álvarez -Argüelles H, Borges R**. Histogenesis and morphofunctional characteristics of chromaffin cells. *Acta Physiol (Oxf).* 192:145-163, 2008.
- Dinkelacker V, Voets T, Neher E, Moser T**. The readily releasable *pool* of vesicles in chromaffin cells is replenished in a temperature-dependent manner and transiently overfills at 37 degrees C. *J Neurosci* 20:8377-8383.2000.
- Doering CJ, Zamponi GW**. Molecular pharmacology of high voltage-activated calcium channels *J Bioenerg Biomembr.* 35:491-505. Review, 2003.
- Donald DE, Shepherd JT**. Autonomic regulation of the peripheral circulation. *Annu Rev Physiol* 42:429-439, 1980.

**Douglas WW, Rubin RP.** Mechanism of nicotinic action at the adrenal 573 medulla: calcium as a link in stimulus-secretion coupling. *Nature* 192:1087-1089, 1961a.

**Douglas WW, Rubin RP.** The role of calcium in the secretory response of the adrenal medulla to acetylcholine. *J Physiol* 159:40-57, 1961b.

**Douglas WW, Kanno T, Sampson SR.** Effects of acetylcholine and other medullary secretagogues and antagonists on the membrane potential of adrenal chromaffin cells: an analysis employing techniques of tissue culture. *J Physiol* 188, 107–120, 1967a.

**Douglas WW, Kanno T, Sampson SR.** Influence of the ionic environment on the membrane potential of adrenal chromaffin cells and on the depolarizing effect of acetylcholine. *J Physiol* 191:107–121, 1967b.

**Duchen MR.** Mitochondria and calcium: from cell signalling to cell death. *J Physiol* 529:57–68, 2000.

**Dulubova I, Sugita S, Hill S, Hosaka M, Fernandez I, Sudhof TC, Rizo J.** A conformational switch in syntaxin during exocytosis: role of munc18. *EMBO J* 18:4372–4382, 1999.

**Dutt S, Matasci M, Sommer L, Zimmermann DR.** Guidance of neural crest cell migration: the inhibitory function of the chondroitin sulfate proteoglycan, versican. *Scientific World Journal*. 6:1114–1117, 2006.

**Endo M, Tanaka M, Ogawa Y.** Calcium induced release of calcium from the sarcoplasmic reticulum of skinned skeletal muscle fibres. *Nature*. 3: 228(5266): 34-36, 1970.

**Engisch KL y Nowycky MC,** Calcium dependence of large dense-core vesicle exocytosis evoked by calcium influx in bovine adrenal chromaffin cells, *J Neurosci* 16 1359-1369, 1996.

**Engisch KL y Nowycky MC.** Compensatory and excess retrieval: two types of endocytosis following single step depolarizations in bovine adrenal chromaffin cells. *J Physiol*. 1; 506:591-608, 1998.

**Elhamdani A, Azizi F y Artalejo CR.** Double patch clamp reveals that transient fusion (kiss-and-run) is a major mechanism of secretion in calf adrenal chromaffin cells: high calcium shifts the mechanism from kissand- run to complete fusion. *J Neurosci* 26: 3030–3036, 2006.

**Erickson JD, Schafer MK, Bonner TI, Eiden LE, Weihe E.** Distinct pharmacological properties and distribution in neurons and endocrine cells of two isoforms of the human vesicular monoamine transporter .Proc Natl Acad Sci U S A. 14: 93(10):5166-5171, 1996.

**Fabiato A.** Calcium-induced release of calcium from the cardiac sarcoplasmic reticulum. Am J Physiol 245(1):C1-14, 1983.

**Fawcett, PR.** An electrophysiological study of the rat adrenal gland in vivo. J Neurol Sci 8:381–383, 1969.

**Fenwick EM, Marty A, Neher E.** A patch-clamp study of bovine chromaffin cells and of their sensitivity to acetylcholine. J Physiol 331:577–597, 1982.

**Fernando JC, Abdallah EA, Evinger M, Forray C, el-Fakahany EE.** The presence of an M4 subtype muscarinic receptor in the bovine adrenal medulla revealed by mRNA and receptor binding analyses.Eur J Pharmacol. 207:297-303, 1991.

**Fidler N, Fernández JM.** Phase tracking: an improved phase detection technique for cell membrane capacitance measurements. Biophys J 56:153-1162, 1989.

**Finnegan JM, Pihel K, Cahill PS, Huang L, Zerby SE, Ewing AG, Kennedy RT, Wightman RM.** Vesicular quantal size measured by amperometry at chromafin, mast, pheochromocytoma, and pancreatic beta-cells. J. Neurochem. 66:1914-1923, 1996.

**Fisher T, Bourque C.** The function of Ca<sup>2+</sup> channel subtypes in exocytotic secretion: new perspectives from synaptic and non-synaptic release. Progress in biophysics and molecular biology. 77:269-303, 2001.

**Forsen S, Linse S, Thulin E, LindegArd B, Martin SR, Bayley PM, Brodin P, Grundstrom T.** Kinetics of calcium binding calbindin mutants. Eur. J. Biochem. 177:47-52, 1988.

**Fox AP, Nowycky MC, Tsien RW.** Single-channel recordings of three types of calcium channels in chick sensory neurones. J Physiol 394:173–200, 1987.

**Fulop T y Smith C.** Physiological stimulation regulates the exocytic mode through calcium activation of protein kinase C in mouse chromaffin cells Biochem. J. 399, 111–119, 2006.

- Garcia, AG, Garcia-De-Diego AM, Gandia L, Borges R, Garcia-Sancho J.** Calcium signaling and exocytosis in adrenal chromaffin cells. *Physiol Rev* 86:1093–1131, 2006.
- Garcia de Diego AM, Arnaiz, JJ, Gandia L, Hernandez- Guijo JM, Garcia AG.** A comparison between acetylcholine-like action potentials and square depolarizing pulses in triggering calcium entry and exocytosis in bovine chromaffin cells. *J Mol Neurosci* 30:57–58, 2006.
- Gerber SH, Südhof TC.** Molecular determinants of regulated exocytosis. *Diabetes*. 51:3-11, 2001.
- Giancippoli A, Novara M, de Luca A, Baldelli P, Marcantoni A, Carbone E, Carabelli V.** Low-threshold exocytosis induced by cAMP-recruited CaV3.2 (alpha1H) channels in rat chromaffin cells. *Biophys J*. 90:1830-41, 2006.
- Gil A, Segura J, Pertusa J y Soria B.** Monte Carlo Simulation of 3-D *Buffered* Ca<sup>2+</sup> Diffusion in Neuroendocrine Cells. *Biophysical Journal* 78: 13–33, 2000.
- Gillis K, Capítulo 7. Sakmann B, Neher E.** Single channel recording. 2nd edition, Plenum press, New York y London, 1995.
- Gillis K, Mossner D, Neher E.** Protein Kinase C enhance exocytosis from chromaffin cells by increasing the size of the readily releasable *pool* of secretory granules. *Neurosci* 16:1209-1220, 1996.
- Giovannucci DR, Hlubek MD, Stuenkel EL.** Mitochondria regulate the Ca<sup>2+</sup> exocytosis relationship of bovine adrenal chromaffin cells. *J Neurosci*. 19:9261-92670, 1999.
- Goda, Y. y Stevens, C.F.** Two components of transmitter release at a central synapse. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91, 12942– 12946, 1994.
- Gunter TE, Pfeiffer DR.** Mechanisms by which mitochondria transport calcium. *Am J Physiol Cell Physiol* 258:755–786, 1990.
- Gunter TE, Gunter KK, Sheu SS, Gavin CE.** Mitochondrial calcium transport: physiological and pathological relevance. *Am J Physiol Cell Physiol* 267:313–339, 1994.
- Heinemann C, von Ruden L, Chow RH, Neher E.** A two-step model of secretion control in neuroendocrine cells. *Pflugers Arch* 424:105-112, 1993.

- Heinemann C, Chow R, Neher E.** Kinetics of secretory response in bovine chromaffin cells following flash photolysis of caged  $\text{Ca}^{2+}$ . *Biophysical Journal* 67:2546-2557, 1994.
- Heizmann CW, Braun K.** Changes in Ca-binding proteins in human neurodegenerative disorders. *TINS*. 15:259-264, 1992.
- Hernandez-Guijo J, Pascual R, García A, Gaudia L.** Separation of calcium channel current components in mouse chromaffin cells superfused with low and high barium solutions. *Pflugers Arch-European Journal of Physiology*. 436:75-82, 1998.
- Herrington J, Park YB, Babcock DF, Hille B.** Dominant role of mitochondria in clearance of large  $\text{Ca}^{2+}$  loads from rat adrenal. *Neuron*. 16:219-28, 1996.
- Hille B.** *Ion channels of Excitable Membranes* 3rd edition. Sinauer Associates, Inc. Sunderland, Massachusetts, USA, 2001.
- Hirano T.** Neural regulation of adrenal chromaffin cell function in the mouse--stress effect on the distribution of [3H]dopamine in denervated adrenal medulla. *Brain Res* 22:238:45-54, 1982.
- Hikita T, Bader MF, Trifaró JM.** Adrenal chromaffin cell calmodulin: its subcellular distribution and binding to chromaffin granule membrane proteins. *J Neurochem*. 43(4):1087-97, 1984.
- Hodel A, Schäfer T, Gerosa D, Burger MM.** In chromaffin cells, the mammalian Sec1p homologue is a syntaxin 1A-binding protein associated with chromaffin granules. *J Biol Chem*. 269:8623-8626, 1994.
- Hodgkin AF, Huxley AL.** Measurement of Current-Voltage Relations in the Membrane of the Giant Axon of Loligo. *Journal of Physiology* 1:424-448, 1952.
- Horrigan F, Bookman R.** Releasable *pools* and the Kinetics of Exocytosis in Adrenal Chromaffin Cells *Neuron* 13:1119-1129, 1994.
- Hollins B, Ikeda SR.** Inward currents underlying action potentials in rat adrenal chromaffin cells. *J Neurophysiol*. 76(2):1195-1211, 1996.
- Hutton JC.** The insulin secretory granule. *Diabetologia* 32. 271-281, 1989.

- Hut YH, Yoo JA Bah SJ Yoo SH.** Distribution profile of inositol 1.4.5 –trisphosphate receptor isoform in adrenal chromaffin cell. *FEBS Lett.*, 579, 2597-2603.
- Hubbard JI, Jones SF, Landau EM.** On the mechanism by which calcium and magnesium affect the release of transmitter by nerve impulses. *J. Physiol* 196: 75-86, 1968.
- Jahn R, Lang T Sudhof TC.** Membrane Fusion. *Cell* 112,519-533, 2003.
- Jarvis SE, Zamponi GW.** Masters or slaves? Vesicle release machinery and the regulation of presynaptic calcium channels. *Cell Calcium* 37:483-488, 2005.
- Jun Kisun, Erika S. Piedras-Rentería, Stephen M. Smith, David B. Wheeler, Seong Beom Lee, Taehoon G. Lee, Hemin Chin, Michael E. Adams, Richard H. Scheller, Richard W. Tsien, and Hee-Sup Shin.** Ablation of P/Q-type  $Ca^{2+}$  channel current, altered synaptic transmission and progressive ataxia in mice lacking the  $\alpha_{1a}$  subunit. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 96: 15245-15250, 1999.
- Kamp MA, Krieger A, Henry M, Hescheler J, Weiergraber M, Schneider T,** Presynaptic 'Ca<sub>v</sub>2.3-containing' E-type Ca channels share dual roles during neurotransmitter release, *Eur. J. Neurosci.* 21:1617–1625, 2005.
- Kaplan y Ellis Davies.** Photolabile chelators for rapid photolytic release of divalent cations. *Proc Natl Acad Sci USA* 85:6571-6575, 1988.
- Kibble AV, Barnard RJ, Burgoyne RD.** Patch-clamp capacitance analysis of the effects of alpha-SNAP on exocytosis in adrenal chromaffin cells. *J Cell Sci* 109:2417–2422, 1996.
- Kidokoro Y y Ritchie AK.** Chromaffin cell action potentials and their possible role in adrenaline secretion from rat adrenal medulla. *J Physiol.* 307:199-216, 1980.
- Kidokoro Y, Miyazaki S, Ozawa S.** Acetylcholine- induced membrane depolarization and potential fluctuations in the rat adrenal chromaffin cell. *J Physiol* 324:203–220, 1982.
- Kim SJ, Lim W, Kim J,** Contribution of L- and N-type calcium currents to exocytosis in rat adrenal medullary chromaffin cells, *Brain Research* 675 (1995) 289-296.
- Kits, K S, de Vlieger T A, Kooi B W, and Mansvelder H D.** 1999. Diffusion barriers limit the effect of mobile calcium *buffer* on exocytosis of large dense cored vesicles. *Biophys. J.* 76:1693–1705.

- Klingauf J, Neher E.** Modeling *buffered*  $\text{Ca}^{2+}$  diffusion near the membrane; implications for secretion in neuroendocrine cells. *Biophys. J.* 72:674-690, 1997.
- Koval LM, Yavorskaya EN, Lukyanetz EA.** Electron microscopic evidence for multiple types of secretory vesicles in bovine chromaffin cells. *Gen Comp Endocrinol* 121:261–277, 2001.
- Leathers, V. L., S. Linse, S. Forsén, and A. W. Norman.** Calbindin-D28K, a 1 alpha, 25-dihydroxyvitamin D3-induced calcium-binding protein, binds five or six  $\text{Ca}^{2+}$  ions with high affinity. *J. Biol. Chem.* 265:9838 –9841, 1990.
- Le Douarin NM, Giordano W. Calloni y Elisabeth Dupin.** The stem cells of the neural crest. *Cell Cycle* 7:8, 1013-1019, 2008.
- Lewis RV, Stern AS, Rossier J, Stein S, Udenfriend S.** Putative enkephalin precursors in bovine adrenal medulla. *Biochem Biophys Res Commun* 89:822-829, 1979.
- Lindau M, Neher E.** Patch-clamp techniques for time resolved capacitance measurements in single cell. *Pflügers Arch*, 146:411-437, 1988.
- Linse S, Johansson C, Brodin P, Grundström T, Drakenberg T, Forsén S.** Electrostatic contributions to the binding of  $\text{Ca}^{2+}$  in calbindin D9k. *Biochemistry*. 1991 Jan 8;30(1):154-62.
- Livett BG.** Adrenal medullary chromaffin cells in vitro. *Physiol Rev* 64:1103–1161, 1984.
- Livett BG.** Chromaffin cells. Roles for vesicles proteins and  $\text{Ca}^{2+}$  in hormone secretion and exocytosis. *Trends Pharmacol Sci* 14:345:348, 1993.
- Liley AW, North KA.** An electrical investigation of effects of repetitive stimulation on mammalian neuromuscular junction. 16:509-527, 1953.
- Llinas R, Sugimori M, Silver RB.** Microdomains of high calcium concentration in a presynaptic terminal. *Science* 256:677–679, 1992.
- Llinas R, Sugimori M, Silver RB.** Presynaptic calcium concentration microdomains and transmitter release. *J Physiol* 86:135–138, 1992.B
- Mansvelder H, Kits K.** Calcium channels and the release of large dense core vesicles from neuroendocrine cells: spatial organization and functional coupling. *Progress in Neurobiology* 62:427-441, Review. 2000.



**Marengo F.** Calcium gradients and exocytosis in bovine adrenal chromaffin cells. *Cell calcium* 38:87-99, 2005.

**Marengo F, Monck J.** Development and dissipation of  $\text{Ca}^{2+}$  gradients in adrenal chromaffin cells *Biophys. J.* 79:1800-1820, 2000.

**Marengo F y Monck R.** Spatial Distribution of  $\text{Ca}^{2+}$  Signals during Repetitive Depolarizing Stimuli in Adrenal Chromaffin Cells. *Biophysical Journal* 85 3397–3417 3397, 2003.

**Marcantoni A, Vandael DH, Mahapatra S, Carabelli V, Sinnegger-Brauns MJ, Striessnig J, Carbone E.** Loss of Cav1.3 channels reveals the critical role of L-type and BK channel coupling in pacemaking mouse adrenal chromaffin cells. *J Neurosci.* 2010 Jan 13;30(2):491-504.

**Matthews EK.** Membrane potential measurement in cells of the adrenal gland. *J Physiol* 189:139–148, 1967.

**Meinrenken Christoph J., Borst J. Gerard G., Sakmann Bert.** Calcium Secretion Coupling at Calyx of Held Governed by Nonuniform Channel–Vesicle Topography. *The Journal of Neuroscience*, 22(5):1648–1667, 2002.

**Michelena P, Garcia-Perez LE, Artalejo AR, Garcia AG.** Separation between cytosolic calcium and secretion in chromaffin cell superfused with calcium ramps. *Proc Natl Acad Sci USA* 90:3284-3288, 1993.

**Micheletti M, Brioschi A, Fesce R, Grohovaz F.** A novel pattern of fast calcium oscillations points to calcium and electrical activity cross-talk in rat chromaffin cells. *Cell Mol Life Sci* 62:95–104, 2005.

**Mishra SK, Hermsmeyer K.** Selective inhibition of T-type  $\text{Ca}^{2+}$  channels by Ro 40–5967. *Circ Res* 75:144–148, 1994.

**Mochida S, Westenbroek RE, Yokoyama CT, Zhong H, Myers SJ, Scheuer T, Itoh K, Catterall WA.** Requirement for the synaptic protein interaction site for reconstitution of synaptic transmission by P/Q-type calcium channels. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:2819-2824, 2003.

**Monck JR, Robinson IM, Escobar AL, Vergara JL, Fernandez JM.** Pulsed laser imaging of rapid  $\text{Ca}^{2+}$  gradients in excitable cells. *Biophys J* 67:505–514, 1994.

- Montero, M., Barrero MJ y Álvarez J.**  $[Ca^{2+}]$  microdomains control agonist-induced  $Ca^{2+}$  release in intact HeLa cells. *FASEB J.* 11, 881-885, 1997a.
- Montero, M., Álvarez J., Scheenen WJ, Rizzuto R, Meldolesi J, Pozzan T.**  $Ca^{2+}$  homeostasis in the endoplasmic reticulum. Coexistence of high and low  $[Ca^{2+}]$  subcompartments in intact HeLa cells. *J Cell Biol.*, 139, 601-611, 1997b.
- Montero M, Alonso MT, Carnicero E, Cuchillo-Ibanez I, Albillos A, Garcia AG, Garcia-Sancho J, Álvarez J.** Chromaffin- cell stimulation triggers fast millimolar mitochondrial  $Ca^{2+}$  transients that modulate secretion. *Nat Cell Biol* 2:57–61, 2000.
- Morgan A, Burgoyne RD** A role for soluble NSF attachment proteins (SNAPs) in regulated exocytosis in adrenal chromaffin cells. *EMBO J.* 14:232-239, 1995.
- Moser T, Neher E.** Rapid Exocytosis in Single Chromaffin Cells Recorded from Mouse Adrenal Slices *J. Neurosci*, 17:2314-2323, 1997A.
- Moser T, Neher E.** Estimation of mean exocytosis vesicle capacitance in mouse adrenal chromaffin cell. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* . 94:6735–6740, 1997B.
- Nagy G, Jun Hee Kim, Zhiping P. Pang, Ulf Matti, Jens Rettig, Thomas C. Sudhof, and Jakob B. Sørensen.** Different Effects on Fast Exocytosis Induced by Synaptotagmin 1 and 2 Isoforms and Abundance But Not by Phosphorylation. *The Journal of Neuroscience*, 11,26(2):632– 643, 2006.
- Nassar-Gentina V, Pollard HB, Rojas E.** Electrical activity in chromaffin cells of intact mouse adrenal gland. *Am J Physiol* 254:675–683, 1988.
- Neher E, Sakmann B.** Single channel currents recorded from membrane of denervated frog muscle fibers. *Nature* 260:779-8026, 1976.
- Neher E, Marty A.** Discrete changes of cell membrane capacitance observe under conditions of enhanced secretion in bovine adrenal chromaffin cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79:6712-6716, 1982.
- Neher E, Augustine GJ.** Calcium gradients and *buffers* in bovine chromaffin cells. *J Physiol* 450:273–301, 1992.
- Neher E.** Vesicle *pools* and  $Ca^{2+}$  microdomains: new tools for understanding their roles in neurotransmitter release. *Neuron* 20:389–399, 1998A.

- Neher E.** Usefulness and limitations of linear approximations to the understanding of  $\text{Ca}^{2+}$  signals. *Cell Calcium* 24:345–357, 1998B.
- Neher E y Zucker RS.** Multiple calcium dependent process related to secretion in bovine chromaffin cells. *Neuron* 10:21-30, 1993.
- Nicholls J, Martin A, Wallace B.** From neuron to brain. 3rd edition, Sinauer Associates, U.S.A, 1992.
- Nofal S, Becherer U, Hof D, Matti U, Rettig J.** Primed vesicles can be distinguished from docked vesicles by analysing their mobility. *The Journal of neuroscience* 27(6) : 1386-1396, 2007.
- Novara M, Baldelli P, Cavallari D, Carabelli V, Gancippoli A, Carbone E.** Exposure to cAMP and beta-adrenergic stimulation recruits  $\text{Ca}_v3$  T-type channels in rat chromaffin cells through Epac cAMP-receptor proteins. *J Physiol.* 558:433-49, 2004.
- O'Connor DT, Frigon RP.** Chromogranin A, the major catecholamine storage vesicle soluble protein. Multiple size forms, subcellular storage, and regional distribution in chromaffin and nervous tissue elucidated by radioimmunoassay. *J Biol Chem* 10:259(5):3237-3247, 1984.
- Olivera BM, Miljanich GP, Ramachandran J, Adams ME,** Calcium channel diversity and neurotransmitter release. The omega conotoxins and omega agatoxins. *Annu Rev Biochem* 63:823-867, 1994.
- Olivos Ore L, Artalejo AR.** Intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  microdomain triggered exocytosis in neuroendocrine cells. *Trends Neurosci* 2:113–115, 2004.
- Olivos Oré L, Artalejo AR.** Muscarinic excitation-secretion coupling in chromaffin cells. *Acta Physiol* 192:213-20, 2008.
- O'Sullivan AJ, Cheek TR, Moreton RB, Berridge MJ, Burgoyne RD.** Localization and heterogeneity of agonist-induced changes in cytosolic calcium concentration in single bovine adrenal chromaffin cells from video imaging of fura-2. *EMBO J* 8:401–411, 1989.
- Pan CY, Kao LS.** Catecholamine secretion from bovine adrenal chromaffin cells: the role of the Na/Ca exchanger. *J. Neurochem* 69:1085–1092, 1997.
- Park YB, Herrington J, Babcock DF, Hille B.**  $\text{Ca}^{2+}$  clearance mechanisms in isolated rat adrenal chromaffin cells. *J Physiol* 492:329–346, 1996.

**Parsons TD, Coorssen JR, Horstmann H, Almers W.** Docked granules, the exocytic burst, and the need for ATP hydrolysis in endocrine cells. *Neuron* 15:1085–1096, 1995.

**Perez Bay AE, Ibañez LI, Marengo FD.** Rapid recovery of releasable vesicles and formation of nonreleasable endosomes follow intense exocytosis in chromaffin cells. *Am J Physiol Cell Physiol*.293(5):1509-22, 2007.

**Phillips JH, BurrIDGE K, Wilson SP, Kirshner N.** Visualization of the exocytosis/endocytosis secretory cycle in cultured adrenal chromaffin cells. *J Cell Biol* 97:1906–1917, 1983.

**Polo-Parada L., Chan S.A. y Smith C.** An activity dependent increased role for L-type calcium channel in exocytosis is regulated by adrenergic signaling in chromaffin cells. *Neuroscience* 143 445–459, 2006.

**Purves D., George J. Augustine, David Fitzpatrick, William C. Hall, Anthony-Samuel LaMantia, James O. McNamara, Leonard E. White.** *Neuroscience* 3ra edición. Sinauer Associates, Inc. Massachusetts USA.2004.

**Pyott y Rosenmund.** The effects of temperature on vesicular supply and release in autaptic cultures of rat and mouse hippocampal neurons. *Journal of Physiology* 539.2. 523–535, 2002.

**Reinhard J, Lang T, Sudhof TC.** Membrane Fusion. *Cell*, 112:519–533, 2003.

**Reinhard J, Scheller RH** SNAREs — engines for membrane Nature Reviews Molecular Cell Biology 7:631-643, 2006.

**Rettig J, Sheng ZH, Kim DK, Hodson CD, Snutch TP, Catterall WA.** Isoform-specific interaction of the alpha1A subunits of brain Ca<sup>2+</sup> channels with the presynaptic proteins syntaxin and SNAP-25. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:7363-7368, 1996.

**Rettig J, Neher E.** Emerging roles of presynaptic proteins in Ca<sup>2+</sup> triggered exocytosis. *Science* 298: 781-785, 2002.

**Rigual R, Montero M, Rico AJ, Prieto-Lloret J, Alonso MT, and Álvarez J.** Modulation of secretion by the endoplasmic reticulum in mouse chromaffin cells. *Eur J Neurosci* 16: 1690–1696, 2002.

- Rickman C, Meunier FA, Binz T, Davletov B.** High affinity interaction of syntaxin and SNAP-25 on the plasma membrane is abolished by botulinum toxin E. *J Biol Chem* 279:644–651, 2004.
- Robinson IM, Finnegan, JM, Monck, JR, Wightman, RM, Fernandez JM.** Colocalization of calcium entry and exocytotic release sites in adrenal chromaffin cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92:2474–2478, 1995.
- Rohlicek V, Schmid A.** Dual frequency method for synchronous measurement of cell capacitance, membrane conductance and access resistance on single cells. *Pflugers Arch* 428:30-38, 1994.
- Roth D, Burgoyne RD.** SNAP-25 is present in a SNARE complex in adrenal chromaffin cells. *FEBS Lett.* 351:207-210, 1994.
- Sala F, Nistri A, Criado M.** Nicotinic acetylcholine receptors of adrenal chromaffin cells. *Acta Physiol.*192:203-212, 2008.
- Santo Domingo J, Vay L, Camacho M, Hernandez San Miguel E, Fonteriz RI, Lobaton CD, Montero M, Moreno A, Álvarez J.** Calcium dynamics in bovine medulla chromaffin cell secretory granules. *European Journal of neuroscience* 28, 1265-1274, 2008.
- Sassa T, Harada S, Ogawa, Rand JB, Maruyana IN, Hosono R.** Regulation of the UNC-18 *Caenorhabditis elegans* syntaxin complex by UNC-13. *J Neurosci* 19:4772-4777, 1999.
- Schroeder TJ, Jankowski JA, Senyshyn J, Holz RW, Wightman R M.** Zones of exocytotic release on bovine adrenal medullary cells in culture. *J. Biol. Chem.* 269:17215-17220, 1994.
- Schonn JS, Maximov A, Lao Y, Südhof TC, Sørensen JB.** Synaptotagmin-1 and -7 are functionally overlapping  $\text{Ca}^{2+}$  sensors for exocytosis in adrenal chromaffin cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 105(10):3998-4003, 2008.
- Segura J, Gil A, Soria B.** Modeling study of exocytosis in neuroendocrine cells: influence of the geometrical parameters. *Biophys J* 79:1771-1786, 2000.
- Seward EP, Chernevskaya NI, Nowycky MC.** Exocytosis in peptidergic nerve terminal exhibits two calcium phases during pulsatile calcium entry. *J. Neurosci.* 15 3390-3399, 1995.
- Simon SM, Llinás RR.** Compartmentalization of the submembrane calcium activity during calcium influx and its significance in transmitter release. *Biophys J.*48(3):485-98,1985.

- Smith C.** A Persistent Activity-Dependent Facilitation in Chromaffin Cells Is Caused by  $\text{Ca}^{2+}$ -Activation of Protein Kinase C. *The Journal of Neuroscience*, 19:589–598,1999.
- Smith C, Moser T, Xu T, Neher E.** Cytosolic  $\text{Ca}^{2+}$  Acts by Two Separate Pathways to Modulate the Supply of Release-Competent Vesicles in Chromaffin Cells Neuron, 20: 1243–1253, 1998.
- Smith SM, Renden R, von Gersdorff H.** Synaptic vesicle endocytosis:fast and slow modes of membrane retrieval. *Trends Neurosci.*31(11):559-68, 2008.
- Smith Gregory D.** Modeling Intracellular Calcium: Diffusion, Dynamics, and Domains. Capítulo 7. *Modeling in the Neurosciences*, 2004.
- Søgaard M, Katsuko T, Ruby Ye R, Geromanos S, Tempst P, Kirchhausen T, Rothman JE, Söllner T.** A rab protein is required for the assembly of SNARE complexes in the docking of transport vesicles. *Cell*:78(6)937-948.1994.
- Sollner T, Bennett MK, Whiteheart SW, Scheller RH, Rothman JE.** A protein assembly-disassembly pathway in vitro that may correspond to sequential steps of synaptic vesicle docking, activation, and fusion. *Cell* 75:409–418,1993.
- Sorensen JB.** Formation, stabilization and fusion of the readily releasable *pool* of secretory vesicles. *Pflugers Arch. Eur J Physiology* 448:347-362, 2004.
- Sørensen J B,** Katrin Wiederhold, Emil M Müller, Ira Milosevic, Gábor Nagy,<sup>1</sup> Bert L de Groot, Helmut Grubmüller, and Dirk Fasshauer. Sequential N- to C-terminal SNARE complex assembly drives priming and fusion of secretory vesicles. *EMBO J* 25(5): 955–966, 2006.
- Spafford J, Zamponi G.** Functional interactions between presynaptic calcium channels and the neurotransmitter release machinery. *Current opinion in neurobiology* 13:308-314, 2003.
- Stanley EF.** The calcium channel and the organization of the presynaptic transmitter release face. *Trends Neurosci.* 20:404-409, 1997.
- Stein C. Michael, Huai B. He and Alastair J. J. Wood.** Basal and Stimulated Sympathetic Responses After Epinephrine. *Hypertension*;32;1016-1021, 1998.
- Stettler H, Beuret N, Prescianotto-Baschong C, Fayard B, Taupenot L, Spiess M.** Determinants for chromogranin A sorting into the regulated secretory pathway are also

sufficient to generate granule-like structures in non-endocrine cells. *Biochem J.* 15: 418(1):81-91, 2009.

**Steyer JA, Horstmann H, Almers W.** Transport, docking and exocytosis of single secretory granules in live chromaffin cells. *Nature* 388:474–478, 1997.

**Steyer JA Almers W.** A real time view of life within 100 nm of plasma membrane. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2:268-276, 2001.

**Tang YM, Travis ER, Wightman RM, Schneider AS.** Sodium-calcium exchange affects local calcium signal decay and the rate of exocytotic secretion in single chromaffin cells. *J Neurochem.* 74(2):702-10,2000.

**Tanner VA, Ploug T, Tao-Cheng JH.** Subcellular localization of SV2 and other secretory vesicle components in PC12 cells by an efficient method of preembedding EM immunocytochemistry for cell cultures. *J Histochem Cytochem* 44:1481-1488, 1996.

**Tsai Chia-Chang, Chih-Lung Lin, Tzu-Lun Wang, Ai-Chuan Chou,2 Min-Yi Chou, Chia-Hsueh Lee, I-Wei Peng, Jia-Hong Liao, Yit-Tsong Chen, and Chien-Yuan Pan.** Dynasore inhibits rapid endocytosis in bovine chromaffin cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 297: 397–406, 2009.

**Tischler AS.** Chromaffin cells as models of endocrine cells and neurons. *Ann N Y Acad Sci* 971:366–370, 2002.

**Trifaró JM, Lee R.** Morphological characteristics and stimulus-secretion coupling in bovine adrenal chromaffin cultures. *Neuroscience* 5(9):1533-1546, 1980.

**Unsicker K, Krisch B, Otten U, Thoenen H.** Nerve growth factor-induced fiber outgrowth from isolated rat adrenal chromaffin cells - impairment by glucocorticoids. *Proc Nati Acad Sci USA* 75:3498-3502, 1978.

**Van Weering JRT, Toonen RF, V Matthijs.** The Role of Rab3a in Secretory Vesicle Docking Requires Association/Dissociation of Guanidine Phosphates and Munc18-1. *PLoS One.* 18; 2(7):e616, 2007.

**Vega T, De Pascual R, Bulbena O, Garcia AG.** Effects of omega-toxins on noradrenergic neurotransmission in beating guinea pig atria. *Eur J Pharmacol* 4:276(3):231–238, 1995.

- Villalobos C, Fonteriz R, Lopez MG, Garcia AG, Garcia-Sancho J.** Inhibition of voltage-gated  $\text{Ca}^{2+}$  entry into GH3 and chromaffin cells by imidazole antimycotics and other cytochrome P450 blockers. *FASEB J* 6:2742–2747, 1992.
- Villalobos C, Nunez L, Montero M, Garcia AG, Alonso MT, Chamero P, Álvarez J, Garcia-Sancho J.** Redistribution of  $\text{Ca}^{2+}$  among cytosol and organella during stimulation of bovine chromaffin cells. *FASEB J* 16:343–353, 2002.
- Vitale ML, Seward EP, Trifaró JM.** Chromaffin cell cortical actin network dynamics control the size of the release-ready vesicle *pool* and the initial rate of exocytosis *Neuron*, 4:353–363, 1995.
- Viveros OH, Diliberto EJ, Hazum E, Chang KJ.** Opiate-like materials in the adrenal medulla: Evidence for storage and secretion with catecholamines. *Mol Pharmacol* 16:1101–1108, 1979.
- Voets T, Neher E, Moser T.** Mechanisms underlying phasic and sustained secretion in chromaffin cells from mouse adrenal slices. *J. Neurosci.* 23:607–615, 1999.
- Voets T.** Dissection of three  $\text{Ca}^{2+}$  dependent steps leading to secretion cells from mouse adrenal slices. *Neuron* 25:537–545, 2000.
- Voets T, Tobias Moser, Per-Eric Lund, Robert H. Chow, Martin Geppert, Thomas C. Sudhof, and Erwin Neher.** Intracellular calcium dependence of large dense-core vesicle exocytosis in the absence of synaptotagmin I. *PNAS* 98(20) 11680–11685 , 2001.
- Poulsen JC, Caspersen C, Mathiasen D, East JM, Tunwell RE, Lai FA, Maeda N, Mikoshiba K, Treiman M.** Thapsigargin-sensitive  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPases account for  $\text{Ca}^{2+}$  uptake to inositol 1,4,5-trisphosphate-sensitive and caffeine-sensitive  $\text{Ca}^{2+}$  stores in adrenal chromaffin cells. *Biochem J.* 1(307):749–758, 1995.
- Von Ruden L, Garcia AG, Lopez MG.** The mechanism of  $\text{Ba}^{2+}$ -induced exocytosis from single chromaffin cells. *FEBS Lett* 336:48–52, 1993.
- Wallace DJ, Chen C, Marley PD.** Histamine promotes excitability in bovine adrenal chromaffin cells by inhibiting an M-current. *J Physiol* 540:921–939, 2002.



- Walter Alexander M., Katrin Wiederhold, Dieter Bruns, Dirk Fasshauer, and Jakob B.Sørensen.** Synaptobrevin N-terminally bound to syntaxin–SNAP-25 defines the primed vesicle state in regulated exocytosis. *J. Cell Biol.* Vol. 188 No. 3 401–413, 2010.
- Weinstein, H., and E. L. Mehler.**  $\text{Ca}^{2+}$  -binding and structural dynamics in the functions of calmodulin. *Annu. Rev. Physiol* 56:213-236,1994.
- Weston JA.** The migration and differentiation of neural crest cells. *Adv Morphol.* 8:41–114, 1970.
- Wightman RM, Jankowski JA, Kennedy RT, Kawagoe KT, Schroeder TJ, Leszczyszyn DJ, Near JA, Diliberto EJ Jr, Viveros OH.** Temporally resolved catecholamine spikes correspond to single vesicle release from individual chromaffin cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 88:10754-10758, 1991.
- Winkler, H y Westhead E.** The molecular organization of adrenal chromaffin granules. *Neuroscience* 5, 1803-1823, 1980.
- Wu MM, Llobet A, Leon Lagnado.** Loose coupling between calcium channels and sites of exocytosis in chromaffin cells. *J Physiol.* 22:5377–5391, 2009.
- Xu T, Naraghi M, Kang H, Neher E.** Kinetic studies of  $\text{Ca}^{2+}$  binding and  $\text{Ca}^{2+}$  clearance in the cytosol of adrenal chromaffin cells. *Biophys J* 73:532–545, 1997.
- Zamponi GW.** Antagonist binding sites of voltage dependent calcium channels. *Drug development research.* 42:131-143, 1997.
- Zamponi GW.** Regulation of presynaptic calcium channels by synaptic proteins. *J Pharmacol Sci* 92:79-83, 2003.
- Zhang L, Zhou L, Vega-Gonzalez A, Mendoza D, Drucker-Colin R.** Extremely low frequency magnetic fields promote neurite varicosity formation and cell excitability in cultured rat chromaffin cells. *Comp Biochem Physiol C Pharmacol Toxicol Endocrinol* 118, 295–299, 1997.
- Zhong H, Yokoyama CT, Scheuer T, Catterall WA.** Reciprocal regulation of P/Q-type  $\text{Ca}^{2+}$  channels by SNAP-25, syntaxin and synaptotagmin. *Nat Neurosci* 2:939-941, 1999.
- Zhou Z, Neher E.** Mobile and immobile calcium *buffers* in bovine adrenal chromaffin cells. *J Physiol* 469:245–273, 1993.

**Zhou Z, Misler S.** Action potential induced quanta secretion of catecholamines from rat adrenal chromaffin cells. *Journal of biological chemistry*. 270:3498-3505, 1995.